Aus der Abteilung für Pädiatrische Haematologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Die antiproliferative Wirkung von Interferon und zytostatischen Substanzen auf menschliche Tumorzellen in vitro untersucht mit der koloniebildenden Agarmethode

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Jochen Buck
aus Reutlingen

1985

Aus der Abteilung für Pädiatrische Haematologie
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Die antiproliferative Wirkung von Interferon und zytostatischen Substanzen auf menschliche Tumorzellen in vitro untersucht mit der koloniebildenden Agarmethode

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Jochen Buck
aus Reutlingen

1985

Dekan: Professor Dr. H. D. Waller
1. Berichterstatter: Professor Dr. D. Niethammer
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. E. Heidemann

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	Seite 1
2.	Materialien und Methode	
2.1	Materialien und Geräte	Seite 8
2.2	Methoden	Seite 13
3.	Ergebnisse	
3.1	Ausbeute an Kolonien bei der Agar-Methode	Seite 24
3.2	Reproduzierbarkeit des Interferon - Effektes mit der Agar-Methode	Seite 26
3.3	Vergleich der Zellinien in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Dauerexposition mit Interferon - β	Seite 28
3.4	Wachstumshemmende Wirkung der Mock - Präparation	Seite 32
3.5	Vergleich des antiproliferativen Effektes von verschiedenen alpha, beta und gamma IFN	Seite 35
3.6	Zeitbegrenzte Interferon - Exposition der Zellinien	Seite 38
3.7	Antiproliferativer Effekt verschiedener Zytostatika	Seite 42
3.8	Ergebnisse der Kombinationsversuche	Seite 50
4.	Diskussion	Seite 61
4.1	Vergleich in vitro - in vivo	Seite 62
4.2	Methodenvergleich	Seite 64
4.3	Antiproliferativer Effekt des IFN	Seite 68
4.4	Wachstumshemmende Wirkung der wärmeinaktivierten Mock - Präparation des IFN - β	Seite 70
4.5	Antiproliferative Wirkungsvergleiche von alpha, beta und gamma Interferonen	Seite 73
4.6	Ausbildung der antiproliferativen Wirkung des Interferons in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit	Seite 76
4.7	Expositionsversuche mit Zytostatika	Seite 78
4.8	Diskussion der Kombinationsergebnisse	Seite 85
5.	Kurze Zusammenfassung	Seite 99
6.	Literaturverzeichnis	Seite 101
7.	Verzeichnis der Abkürzungen	Seite 119

I. EINLEITUNG

In dieser Arbeit wird hauptsächlich die Wirkung von Interferon in Kombination mit zytostatischen Substanzen auf menschliche Tumorzellen untersucht.
Interferon wurde erstmals 1956 von ISAACS und LINDEMANN als antiviral wirksame Substanz beschrieben (62).
Nachdem Interferon in den Jahren nach seiner Entdeckung aus verschiedenen Gründen wenig Beachtung fand, erlebte die Interferonforschung in den letzten 10 Jahren eine Zeit umfangreicher Auseinandersetzungen.
Über Interferone ist bekannt, daß sie eine Gruppe von induzierbaren Glykoproteinen sind, die auf bestimmte Reize hin von eukaryonten Zellen abgegeben werden und die Fähigkeit haben, die Virusreplikation zu hemmen. Solche Reize für die Zelle sind RNS- oder DNS- Viren, synthetische Polynukleotide, Bakterien, mitogene Substanzen oder andere Stoffe. Sowohl Reizsubstanz als auch Zellart bestimmen die Unterschiedlichkeit der Interferone (109).

Für das humane System sind folgende Interferone bekannt: (97)

1) Leukozyteninterferon IFN - α : Wahrscheinlich 10 - 12 Arten
2) Fibroblasteninterferon IFN - β : Wahrscheinlich 2 Arten
3) Immuninterferon IFN - γ

Neben der antiviralen Eigenschaft (95) werden den Interferonen noch andere Aktivitäten zugeschrieben; diese seien tabellarisch genannt:

1. Das Immunsystem betreffende Wirkungen

   a) Depression des B - Zellsystems (42)
   b) Stimulation der Phagozytose (89)
   c) Stimulation der Zytotoxität von T- und NK- Zellen (72,90)

2. Änderung der Membranstruktur (83)

3. Stimulation der Zelldifferenzierung (109)

4. Antiproliferative Wirkung durch Inhibition der Zellmultiplikation (81)

Die antiproliferative Wirkung der Interferone ist eine zentrale Frage der Interferonforschung. Dies zeigt auch der folgende Rückblick über die wichtigsten Arbeiten auf diesem Gebiet.

PAUCKER, CANTELL und HENLE berichteten 1962 als erste, daß Interferon das Wachstum von Zellinien hemmt (81).
COCITO und andere führten diesen Effekt auf "nicht Interferon"-Verunreinigungen in ihren Interferonzubereitungen zurück, da sie ihn mit etwas gereinigterem Interferon nicht mehr nachweisen konnten (25, 70).

Von vielen Untersuchern (2, 42, 44, 58, 64) wurde behauptet, daß der antiproliferative Effekt vom Interferonmolekül abhängt, während andere (11, 17, 59) entweder mit Interferon keine Hemmung messen konnten oder keine Beziehung im Verhältnis von einerseits antiviraler und andererseits antiproliferativer Aktivität beobachten konnten.

Der Beweis für eine dieser beiden Thesen hing einerseits von der Fähigkeit ab, die Hemmung genau messen zu können und für andere reproduzierbar zu machen, andererseits von der Möglichkeit, Interferone von sehr hohem Reinheitsgrad herzustellen, um diese auf ihre zellwachstumshemmende Wirkung zu prüfen.

Die Bedingungen für die Reproduzierbarkeit wurden in den Arbeiten von LINDAHL - MAGNUSSON 1971 dargestellt (71).
GRESSER (49) und KNIGHT (64) haben 1973 mit hoch gereinigtem Interferon den Zusammenhang von antiviraler und antiproliferativer Aktivität nachgewiesen.
Trotzdem ist es möglich, daß ein Teil des antiproliferativen Effektes durch Fremdproteine verursacht wird. Man hat mit MOCKpräparaten* (36, 82) den antiproliferativen Effekt, der durch Verunreinigungen verursacht wird, von dem des Interferonmoleküls getrennt gemessen. In den wenigen bisher veröffentlichten Arbeiten wurde von einigen Untersuchern (35, 58, 60) bei MOCK - Konzentrationen, die 10^3 I.U./ml Interferon entsprechen, eine Zellvermehrungshemmung beobachtet.* Jedoch scheint es auch hier Unterschiede zu geben, denn andere Untersucher (2, 38, 8) konnten diesen MOCKeffekt mit niedrigeren Konzentrationen oder anderen Präparaten nicht feststellen.

Zusammenfassend können als Nachweise für die antiproliferative Aktivität von Interferonen folgende Untersuchungen angeführt werden:

a) Wenig und hochgereinigte Interferone, unabhängig von Zellquelle und induzierenden Substanzen, üben in konstantem Verhältnis einen relativ wirtsspezifischen antiviralen und antiproliferativen Effekt aus (49, 96).

b) Die antiproliferative Komponente erfüllt alle Interferonkriterien (75).

* MOCK: Präparat mit derselben Zusammensetzung wie das Interferonpräparat ohne das Interferonmolekül oder mit inaktiviertem Interferon.

c) Mäuse L_{1210}- Zellen, die resistent sind gegen die antivirale Aktivität von Interferon (43) oder unfähig sind, Interferon zu binden (50), sind auch resistent gegen die antiproliferative Aktivität von Interferonen (44). Umgekehrt gilt, daß für Chromosomen 21 trisomale menschliche Zellen, die antiviral empfindlicher mit Interferon reagieren (103), auch empfindlicher sind gegenüber seiner vermehrungshemmenden Wirkung (27). Wahrscheinlich können trisomale Zellen vermehrt Interferon binden (117).

d) Menschliche alpha - und beta - Interferone ergeben in der Elektrophorese mit SDS-Poliacrylamidgel gleiche Banden für die antivirale und antiproliferative Aktivität (118).

e) Hochgereinigtes Mäuseinterferon, spez. Aktivität 10^9 I.U./mg Protein (51) und menschliches Interferon - B, spez. Aktivität 2×10^9 I.U./mg Protein (65), ist gleich wie ungereinigtes Interferon fähig, die Zellvermehrung zu hemmen.
Dies gelang auch mit Mäuseinterferoid* (95).

f) Wie oben angeführt, sind heute verschiedene Interferone bekannt. Von allen wird in der Literatur eine antiproliferative Aktivität berichtet (14), wobei IFN - α schwächer wirksam sein soll als IFN - B.
Das jetzt zur Verfügung stehende IFN - γ soll antiproliferativ stärker sein als IFN - α oder IFN - B.
In vergleichenden Untersuchungen wurden die Interferone hinsichtlich der antiproliferativen Wirkung auf verschiedene Zellinien unter dieser Fragestellung verglichen (siehe 3.5.).

* Interferon ist ein Glykoprotein.
Interferoid ist das Protein ohne den Kohlehydratanteil.

STRANDER begann 1972 mit den ersten Behandlungsversuchen mit Interferon bei Patienten mit osteogenem Sarkom.
Die Ergebnisse nach einer 5 jährigen Beobachtungszeit der Studie vermittelt die Tabelle.

Metastasierung nach Monat	Gruppe mit IFN - α	konkurrierende Kontrollgruppe	historische Kontrollgruppe
6	16 %	27 %	57 %
18	43 %	60 %	86 %
60	54 %	75 %	86 %

In der Interferongruppe befanden sich zu diesem Zeitpunkt 38 Patienten. Die mit Interferon behandelte Gruppe zeigt gegenüber der konkurrierenden Kontrollgruppe und der historischen Kontrollgruppe die besseren Ergebnisse.

Ein Überblick über die bisherigen Behandlungsversuche bei primär und sekundär metastasierenden Erkrankungen und deren Ergebnisse bietet die folgende Tabelle:

KR = komplette Remission
PR = partielle Remission
GZ = Gesamtzahl

Interferon - α	KR	PR	GZ	
Myelom	2	5	9	MELSTED (102)
Non Hodgkin	3	0	6	MERIGAN (79)
Leukämien:				
CML	0	2	4	GUTTERMANN (109)
ALL	5	0	5	HILL (61) High Dose
AML	3	0	3	HILL (61) High Dose
Mammakarzinom	0	7	17	GUTTERMANN (53)
	0	11	26	BORDEN (16)
Kolonkarzinom	0	3	7	GUTTERMANN (109)
Prostatakarzinom	0	4	4	GUTTERMANN (109)
Ovarialkarzinom	0	4	7	GUTTERMANN (109)
Interferon - B				
Nasophayngealkarzinom	1	2	5	TREUNER (107)

Durch die in-vitro - Testung menschlicher Tumorzellen auf Interferon können Hinweise für die klinische Anwendung gefunden werden. Es ergaben sich Parallelen in der Empfindlichkeit von Tumoren gegen IFN in vitro und in vivo (100).
Nachdem man bis heute nur bei wenigen Tumorarten mit den zur Verfügung stehenden Interferonen größere Erfolge erzielen konnte, geht man jetzt in der Therapie dazu über, Interferone mit Zytostatika zu kombinieren.

In der BRD laufen zur Zeit zwei randomisierte Behandlungsprotokolle mit Interferon in Kombination mit Zytostatika:

1) Die COSS 80 Studie bei Patienten mit osteogenem Sarkom: Sie besteht aus 4 Teilen. Alle Patienten werden gleich mit Methotrexat und Adriamycin behandelt.

   Gruppe A erhält zusätzlich Bleomycin, Cyclophosphamid und Actinomycin D,
   Gruppe A 1 ohne, Gruppe A 2 mit Interferon.

   Gruppe B erhält zusätzlich Cis - platinum,
   Gruppe B 1 ohne, Gruppe B 2 mit Interferon (116).

2) Die Neuroblastomstudie Stadium IV bei Kindern:
   Hier erhalten alle Patienten die Zytostatika Adriamycin, Cyclophosphamid, Vincristin, DTIC und eine Gruppe mit, die andere ohne Interferon (108).

Für eine derartige Kombinationsbehandlung gibt es jedoch wenige in-vitro-Versuche (1, 19, 24, 52, 92).
Bei Kombinationstherapien stellt sich die Frage nach der Interferenz der kombinierten Medikamente, denn die Summe der Wirkungen kann von antagonistisch bis synergistisch reichen.
Forschungen, die in vitro Hinweise für eine erfolgversprechende Kombinationstherapie geben, können eine Hilfestellung sein für die klinische Anwendung.

Ein großer Teil dieser Arbeit war solchen Kombinationsversuchen von Interferon mit Zytostatika gewidmet (siehe 3.8).
Wenig ist auch darüber bekannt, wie lange Interferon auf Zellen einwirken muß, um einen antiproliferativen Effekt auszulösen.
In der Literatur gibt es hierzu sehr widersprüchliche Angaben (18, 45, 82).
Es wurde versucht, diese Zeitspanne in vitro nach abgestufter Zeitexposition von Interferonen auf Zellen durch den Grad der ausgelösten Zellvermehrungshemmung und den Anstieg der 2' - 5' - Synthetase zu bestimmen (siehe 3).

Für diese Versuche wurde die von SALMON und HAMBURGER entwickelte kolonienbildende Agarmethode (87) benutzt.
In einer gleichzeitig von M. DILGER ausgeführten Arbeit wurden dieselben Versuche mit der durch die Untersuchungen von STRANDER bekannten Monolayer-Methode (101) gemacht.

Dadurch ergab sich die Möglichkeit, die Resultate zweier vom Ansatz her verschiedener Methoden vergleichend zu diskutieren und die beiden Methoden einander gegenüberzustellen.

2. MATERIALIEN und METHODE

2.1. MATERIALIEN und GERÄTE

2.1.1. ZELLINIEN

Zellinie	Originaltumor	etabliert von/zur Verfügung gestellt von
RD (ATCC CCL 136)	Rhabdomyosarkom embryonal	etabliert von Mc ALLISTER, Febr.68 (78)
SAOS - 2	Osteosarkom	zur Verfügung gestellt von Dr.JØRGEN FOGH vom Sloan-Kettering Institute of Cancer Research (39)
IMR - 32 (ATCC CCL 127)	Neuroblastom	etabliert von W.W.NICHOLS J.LEE, S.DWIGHT, April 67 (112) am Sloan-Kettering Institute of Cancer Research
SK - N - FI	Neuroblastom	zur Verfügung gestellt von Dr.JØRGEN FOGH vom Sloan-Kettering Institute of Cancer Research

2.1.2. ZYTOSTATIKA

"Generic name"		Handelsname	Firma
Actinomycin D	(Act.D.)	LYOVAG - COSMEGEN®	MERCK
Adriamycin	(ADR)	ADRIBLASTIN®	MONTEDISON PHARMA
BCNU	(BCNU)	CARMUBRIS®	BRISTOL
Cis-platinum	(Cis-p)	PLATINEX®	BRISTOL
DTIC	(DTIC)	DTIC - DOME®	MILES LABORATORIES
Methotrexat	(MTX)	METHOTREXAT "Lederle"®	LEDERLE
Vincristin	(VCR = Vin)	VINCRISTIN LILLY®	Lilly
VP - 16	(VP - 16)	VEPESID®	BRISTOL

2.1.3. Interferone und damit zusammenhängende Substanzen

2.1.3.1. Interferone

Interferonart	Ursprung	Aktivität	zur Verfügung gestellt von
IFN – α	humane Leukozyten	1×10^6 IU/ml	Dr.H.CANTELL Helsinki (21)
IFN – α	humane Lymphoblasten (Namalva)	1×10^6 IU/mg	A.MIZRAHI,ph.D. Departement of Biotechnology Ness Ziona, Israel (9/91)
IFN – α_2	E.coli	$1{,}5 \times 10^6$ IU/ml	M.FOUNTOULAKIS Universität Zürich (80)
IFN – B	humane Fibroblasten	$2{,}3 \times 10^6$ IU/mg	Fa.RENTSCHLER Laupheim (110)
IFN – B	humane Fibroblasten	2×10^8 IU/mg $2{,}5 \times 10^3$ IU/ml	E.KNIGHT (67) Wilmington, USA
IFN – γ	humane Leukozyten	$2{,}5 \times 10^3$ IU/ml	H.K.NIELSEN Interferon Research Laboratory, Hjoerring Denmark

2.1.3.2. Mock – Interferone und Inducer von IFN – γ

Mock-Präparation aus induziertem IFN – B der Fa. RENTSCHLER
hitzeinaktiviert bei 41 °C,
spez. Aktivität < 90 IU/mg Protein

Inducer zur Herstellung von IFN – γ von H.K.NIELSEN Denmark

2.1.3.3. Antikörper gegen IFN – B

Humanes Serum mit Antikörpern gegen IFN – B (114)
neutralisiert 10^4 IU IFN – B/ml

"Generic name"	Klasse chemische Bezeichnung (32)	P.C. ug/ml (7)	CXT ug.h/ml (7)	Plasma-halbwertszeit (7)	zytostatische Wirkungsweise (31)	Zellzyklusphasen-spezifisch	klinische Studie
Actinomycin D (Dactinomycin)	Antibiotikum aus Streptomyces v. parvullus	0,075	0,182	$t_{1/2}$ term. = 28 - 36 h	Bindung zwischen oder an Purin-Pyrimidin-Basen-Paar der DNA. Verhinderung der DNA - abhängigen RNA - Synthese (v.a. m - RNA)	nein	COSS 80
Adriamycin (Doxorubicin)	Antibiotikum aus Streptomyces peucetius var cassius; Anthrazyklin	0,5	1,38	$t_{1/2}$ initial =30 min dann über Tage konstant	schiebt sich zwischen korrespondierendes Basenpaar der DNA. Verhinderung der DNA - vermittelten RNA - und DNA-Transkription.	nein	COSS 80 CWS 81 Neuroblastom
BCNU (Carmustine)	Nitroharnstoff 1,3 bis chloro (2-chloroethyl) 1 - nitrourea	1,97	1,02	15 - 30 min	intrazellulär entstehende Metaboliten alkylieren DNA und interferieren mit DNA betreffenden Enzymreaktionen. Hemmung d.DNA - Synthese und DNA - Reparatur	nein	
Cis-platinum	Cis-diamine-dichloroplatinum II	2,5	1,94	$t_{1/2}$ initial =25 - 79min	Inhibitor von DNA-Precursoren. Verhinderung der DNA-Ablesung. verliert intrazellulär seine beiden Chloridanionen, wirkt dann alkylierend	nein	COSS 80 CWS 81
DTIC (Dacarbazine)	5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamid	15	30,72	$t_{1/2}$ initial = 35 min	Alkylierend über Carbonium - Ion. Interaktion mit Sulfhydryl(SH -)gruppen in Proteinen	**nein, am aktivsten in später G_2 - Phase**	CWS 81

Methotrexat (MTX)	Antimetabolit	10^{-4} mol *		in Kindern bei Hoch – Dosis Ther. $t_{1/2initial}$ = 1,2h $t_{1/2\ term.}$ = 10,4 h	Bindung an Dihydrofolat Reduktase. Dadurch Blockierung der Reduktion der Dihydrofolsäure Hemmung der DNA, RNA und Proteinsynthese.	ja S-Phasen spezifisch	COSS 80
Vincristin	Alkaloid aus Vinca rosea	0,3	0,47	$t_{1/2\ initial}$ = 20 min $t_{1/2\ term.}$ = 160 min	Reversible Bindung an Mikrotubuli- und Spindelproteine in S-Phase Verhinderung der Mitose durch Verhinderung der Zellteilung. Unterbrechung der RNA- u. DNA-Synthese durch Wirkung auf DNA- vermittelte RNA Polymerase.	ja Metaphase der Mitose bzw. S – Phasen spezifisch	CWS 81 Neuroblastom
VP 16 (Etoposid)	halbsynthetisches Podophyllotoxin aus Podophyllum amodi	30	91	$t_{1/2\ term.}$ = 3 – 15 h	Hemmung des Zellzyklus während Metaphase d. Mitose. Keine Bindung an Proteine der Mikrotubuli. Lyse der Zellen bei Mitoseeintritt, wenn 10 ug/ml Hemmung der DNA, RNA, Proteinsynthese.	ja? Mitose spezifisch, G_2-S-Phase auch betroffen.	

Tab. * Mitteilung von Dr. H. Diddens, Kinderklinik Tübingen

Wesentliche Eigenschaften, der in dieser Arbeit verwendeten Zytostatika

CXT: Produkt aus Plasmakonzentration und Zeit P.C.: "Peak – Konzentration" im Serum

COSS 80: Cooperative Osteosarkom – Studie 1980 der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie

CWS 81: Cooperative Weichteilsarkom – Studie 1981 der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie

2.1.4. Materialien für den Umgang mit Zellkulturen und für die Monolayer - Methode

Minimal Essential Medium (MEM) mit Earles Salzen Glutamin Phenolrot Bicarbonat 0,25g/l Hepes Puffer 20 mM Gentamicin 50 ug/ml Fetales Kälberserum 5 % (FKS)		RENTSCHLER Laupheim
Fetales Kälberserum, hitzeinaktiviert		RENTSCHLER Laupheim
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) Ca & Mg frei		GIBCO EUROPE
Ampuwa: steriles pyrogenfreies Wasser		FRESENIUS
Versen - Trypsin		RENTSCHLER
Trypanblau, 0,4 %		
Fuchs - Rosenthal - Zählkammer		
Kulturflaschen, Plastik, 250 ml	NUNCON®	INTERMED
Laborzentrifuge	ROTIXA®	HETTICH
Zentrifugengläser, 15 ml, konisch		FALCON
Phasenkontrastmikroskop Vergr. 40 x, 100 x, 200 x, 400 x	IM®	OLYMPUS
Laminar Flow Area Fallstromprinzip		CEAG SCHIRP Rheinraum-technik
Brutschrank	NATIONAL®	HERAEUS
beschichtete Sechslochplatten mit Deckel 35 mm Ø, Fläche 9,62 cm^2, Inhalt 9,6 ml		GREINER Labortechnik
Coulter Counter	COULTER Electronics	DUNSTABLE England

2.1.5. Spezielle Materialien für die semisolide Agarmethode

Sechs - Loch-Platten mit Deckel, 35 mm Ø	GREINER Labortechnik
Agarose Type IV, No. A - 3543	SIGMA, München
L-Glutamin (100x), 200 mM	SEROMED, "
Insulin, No. I - 5500	SIGMA, "
2 - Mercapthanol, No. m - 250	SIGMA, "
DEAE - Dextran, Mol. Gew. 500 000	PHARMACIA, Fine Chemic.

Angereichertes Medium:

1 000 ml werden hergestellt aus 800 ml MEM mit Zusätzen
150 ml inaktiviertes FKS
50 ml L-Glutamin
1 ml Insulinlösung verdünnt.

2.2. METHODEN

2.2.1. Kultivierung der Zellinien

Alle Zellinien wurden als Monolayer in Kulturflaschen in MEM mit Zusätzen gehalten. Die konstanten Inkubatorbedingungen waren 37°C und 5 % CO_2, 95 % Luftfeuchtigkeit.
Die Zellen wurden alle 4 - 7 Tage passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgezogen und der Zellrasen mit 1 ml auf 37°C aufgewärmtem Trypsin abgelöst. Die Zellen wurden in einigen ml warmem Medium suspendiert und 1 : 2 bis 1 : 10 verdünnt neu ausgesät.
Das Kulturmedium wurde alle 3 - 4 Tage erneuert.
Die Zellinien wurden 1 - 2 Tage vor dem jeweiligen Versuchsansatz passagiert. Hierdurch sollten zu Versuchsbeginn konstante Bedingungen herrschen in Hinsicht auf die das Zellwachstum hemmende Faktoren Nährstoff und Raum.

2.2.2. KOLONIENBILDENDE AGARMETHODE (semisolide Agarmethode)

Diese Methode wurde 1977 von HAMBURGER und SALMON entwickelt, (54, 55, 56). Sie wurde nach CARNEY (22) modifiziert. Bei dieser Methode werden zwei Agarschichten verschiedener Konsistenz übereinandergegossen; die untere, keine Zellen enthaltende Schicht wird als "Base-layer", die obere zellhaltige Schicht als "Upper-layer" bezeichnet (siehe Abb.1).

Die Zellkulturen wurden zu Versuchsbeginn 1 x mit HBSS gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Trypsin aus ihren Kulturflaschen gelöst und in warmem MEM suspendiert. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde die Lösung mehrmals kräftig auf- und abpipettiert. Nach der Bestimmung der Zellzahl in der Fuchs - Rosenthal-Zählkammer oder im Coulter-Counter wurde die Zellzahl in MEM so eingestellt, daß sich soäter im "Upper-layer" 5×10^4 Zellen / ml befanden.

Die Zellen wurden jetzt je nach Versuchsart sofort dem Upper - layer - Gemisch zugefügt oder vorher noch eine bestimmte Zeit mit dem jeweiligen Medikament inkubiert (siehe Tab. 1).

Vor dem "Upper-layer" wurde der keine Zellen enthaltende "Base-layer" gegossen, pro Loch 1,5 ml. Diese Base - layer - Lösung bestand aus angereichertem Medium und 0,5 % Agarose.

Danach wurde 1 ml Upper - layer - Lösung auf den bei Zimmertemperatur erstarrten Base layer gegossen. Diese Upper - layer - Lösung war aus Zellsuspension, angereichertem Medium und 0,3 % Agarose zusammengesetzt. Bei den Versuchen mit Interferon - Dauerexposition kam noch Interferon in die Lösung. Nach dem Festwerden wurde unter dem Mikroskop geprüft, ob die Tumorzellen wirklich als einzelne Zellen im "Upper-layer" lagen (siehe Photo 1a).

Die Agarplatten wurden nun im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO_2 inkubiert.

SEMISOLIDE AGARMETHODE

etablierte Zellinie

↓

Einzelzellsuspension

Einzelzellsuspension → x-min Exposition

x-min Exposition → UPPER-LAYER

BASE-LAYER

angereichertes Medium

+ 0,5 % Agarose

↓ 1,5 ml

UPPER-LAYER

5×10^4 Zellen/ml

angereichertes Medium

+ 0,3 % Agarose

± Medikament bei Dauerexposition

↓ 1,0 ml

Auszählung der Kolonien nach 14-21 Tagen

nach dem Ausgelieren →

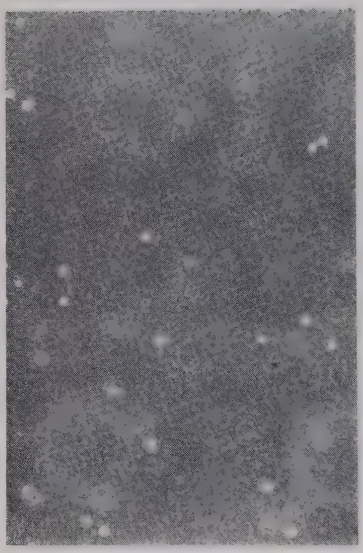
Base-Layer

Upper-Layer

Base-Layer

Petri-Schale

Inkubation bei 37°C/5 % CO_2 →



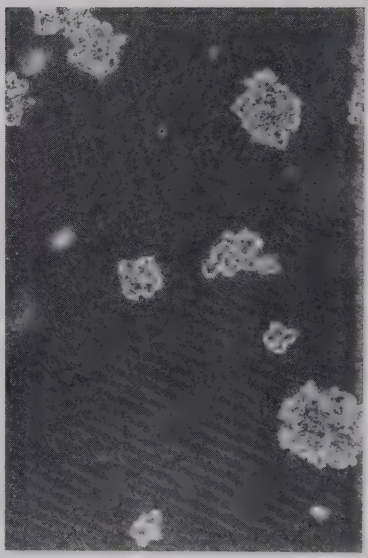


Photo 1a: Einzelzellsuspension
Vergrößerung 100 x

Photo 1b: Cluster und 3 Kolonien
Vergrößerung 100 x

Aus einem bestimmten Teil der Zellen wurden Cluster und Kolonien. Cluster sind laut Definition solide Zellverbände aus 5 - 49 Zellen, Kolonien bestehen aus 50 und mehr Zellen (55) (siehe Photo 1b).

Nach 14 - 21 Tagen wurde die Anzahl der Kolonien gezählt. Ein Zellhaufen wurde als Kolonie gezählt, wenn er so groß oder grösser wie ein Raster im Phasenkontrastmikroskop bei 100 facher Vergrößerung war. Ein solches Raster entspricht einer Fläche von 0,1 mm x o,1 mm.

Jeder Versuch wurde dreifach gemacht. Aus den drei erhaltenen Koloniezahlen wurde der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.

Die Hemmung der Koloniebildung wurde ermittelt durch Bildung des Quotienten:

$$\frac{\text{Zahl der behandelten Kolonien}}{\text{Zahl der Kontrollkolonien}} \times 100.$$

Tabelle 1

KOLONIENBILDENDE AGARMETHODE

Versuche, bei denen die Zellen...

1) kontinuierlich Interferon ausgesetzt waren

DAUEREXPOSITION

Zellsuspension

↓

Upper-layer mit Interferon

2) nur eine bestimmte Zeit dem Medikament ausgesetzt waren

ZEITVERSUCHE

Zellsuspension

bestimmte Zeit mit Medikament in MEM inkubiert ($37^{o}C$, 5 % CO_2)

zentrifugiert (10', 1200 min^{-1})

Überstand abgezogen

in HBSS gelöst

zentrifugiert (10', 1200 min^{-1})

Überstand abgezogen

↓

Upper-layer ohne Interferon

3) eine Stunde dem Zytostatikum und dann dem Interferon ausgesetzt waren

KOMBINATIONSVERSUCHE

Zellsuspension

eine Stunde mit Zytostatikum in Mem inkubiert ($37^{o}C$, 5 % CO_2)

zentrifugiert (10', 1200 min^{-1})

Überstand abgezogen

in HBSS gelöst

zentrifugiert (10', 1200 min^{-1})

Überstand abgezogen

↓

Upper-layer mit Interferon

2.2.3. MONOLAYER-METHODE (36) (von MANFRED DILGER durchgeführt)

Die Zellen wurden -soweit nicht anders vermerkt- in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/Loch ausgesät.
Die Ausgangszellzahl wurde so ausgewählt, daß der Zellrasen nach 1 Woche die Plateauphase noch nicht erreicht hatte.
Die in 1 ml gelösten Zellen wurden mit 2,5 ml MEM gemischt und anschließend wurde 0,4 ml HBSS mit oder ohne Medikament zugefügt.
Ein Loch enthielt somit in 4 ml 10^5 Zellen.
Nach 4 Tagen wurde das MEM ohne erneute Medikamentenzugabe gewechselt.
Nach 1 Woche wurden die Platten ausgewertet.
Dazu wurde das MEM abgezogen, die Zellen mit 0,5 ml Trypsin/Loch abgelöst und in 2,5 ml MEM suspendiert. Die Konzentration der Suspension wurde durch Zellzählung im Coulter Counter ermittelt. Von dieser Suspension wurden wieder 10^5 Zellen pro Loch ausgesät und wie zu Versuchsbeginn behandelt.

Bei den Versuchen wurde auf jeder Platte eine, insgesamt jedoch mindestens 6 Kontrollen mitgeführt. Die drei gleich behandelten Versuchsansätze wurden auf verschiedenen Platten verteilt, da die Platten unterschiedliche Wachstumsbedingungen boten.
Der Anteil der toten Zellen wurde mit Trypanblaufärbung ermittelt.
Eine Hemmung der Zellvermehrung wurde ermittelt durch Bildung des Quotienten:

$$\frac{\text{Zahl der behandelten lebenden Zellen}}{\text{Zahl der Zellen der Kontrolle}} \times 100.$$

Aus den Quotienten der gleich behandelten Zellen wurde jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

2.2.3. Interferonansatz

Die benötigten Interferon - Konzentrationen wurden vor jedem Versuch aus definierten Vorverdünnungen mit HBSS hergestellt. Die Ansätze waren so berechnet, daß wir bei beiden Methoden die gleiche Interferonkonzentration / ml erhielten.

Beim Monolayeransatz wurde jeweils 0,4 ml Interferonlösung 3,5 ml Zellsuspension zugesetzt, bei der Agar - Methode 0,1 ml Interferonlösung 0,9 ml Zellsuspension.

Einer Interferonkonzentration von 100 IU/ml entsprechen bei
der Monolayermethode 4×10^{-3} IU/Zelle,
beim Agar 2×10^{-3} IU/Zelle.

Die Interferonaktivitäten wurden mit dem Virusplaque - Reduktionsassay kontrolliert (29).

2.2.4. Zytostatikaansatz

Die Zytostatika wurden vor jedem Versuch aus standardisierten Klinikpackungen mit HBSS verdünnt.

2.2.5. STATISTIK

2.2.5.1. Allgemeine Statistik

Alle Versuche wurden dreifach durchgeführt. Aus den Ergebnissen der gleichen Ansätze wurden Mittelwert und Standardabweichung ermittelt. Diese sind in den Zeichnungen entweder graphisch dargestellt oder tabellarisch angefügt.

2.2.5.2. Statistik der Kombinationsversuche

Für die Auswertung der Kombinationsversuche wurde ein von DREWINKO (33) verwendeter Test unter Berücksichtigung der Kovarianzen abgeändert.*

Bei dem Test setzten wir als Nullhypothese fest, daß die Wirkung beider Medikamente additiv sei, bei einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0{,}01$.

Als Additivität definierten wir die Bedingung

$S_{F_{AB}} = S_{F_A} \times S_{F_B}$

d.h. Die Differenz

$D = S_{F_{AB}} - S_{F_A} \times S_{F_B} = 0$

S_{F_A} = überlebende Zellen/Kolonien nach Medikament A

S_{F_B} = überlebende Zellen/Kolonien nach Medikament B

$S_{F_{AB}}$ = überlebende Zellen/Kolonien Kombination von Medikament A+B

Die Differenz D wurde anhand des Quotienten

$$U = \frac{D}{\sqrt{Var\ D}}$$ geprüft. Unter der Annahme, daß D normal verteilt ist, wurde die Nullhypothese $D = 0$ verworfen, wenn $U \geq |2{,}58|$ $(\alpha = 0{,}01)$ ist.

U - Wert	Kombination 2er Medikamente
$U > +2{,}58$	antagonistisch mit einer Täuschungswahrscheinlichkeit < 1 %
$+2{,}58 \geq U \geq -2{,}58$	im additiven Bereich
$U < -2{,}58$	synergistisch mit einer Täuschungswahrscheinlichkeit < 1 %

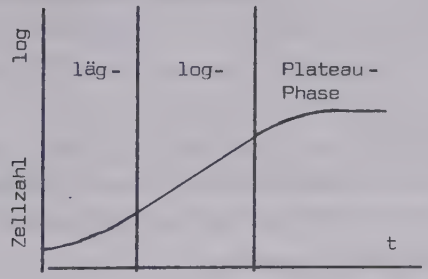
* Abänderung und Aufstellung des Computerprogramms von PD Dr. BRÜGGMANN, Kinderklinik Tübingen. Die Rechnung erfolgte auf einem HP 85 Computer von HEWLETT PACKARD.

2.2.6. FEHLERBETRACHTUNG

2.2.6.1. Statistik

Eine Voraussetzung des Tests war die Normalverteilung von D; sie hat wegen der geringen Zahl der durchgeführten Versuche nur approximative Gültigkeit.
Zu Beginn wurde deshalb ein hohes Signifikanzniveau (α = 0,01) festgesetzt.
Über die Größe des Fehlers der 2. Art können mit dem Test keine Aussagen gemacht werden.

2.2.6.2. Wachstumsverhalten der Zellen



Die Zeichnung zeigt ein ideales Wachstum von Zellen in Monolayerflaschen bei konstanten Umweltbedingungen. Zellen in Zellkulturen reagieren in den einzelnen Phasen der Wachstumskurve verschieden auf wachstumshemmende Substanzen (77). Indem wir die Kulturen bei beiden Methoden 2 - 3 Tage vorher passagierten, wollten wir erreichen, daß sie sich zu Versuchsbeginn in der reproduzierbaren log - Phase befanden.

2.2.6.3. Ausbeute an Kolonien im Agar ("cloning efficiency")

Zur quantitativen Auswertung der Versuche ist es notwendig, daß bei der Agarmethode die Zahl der ausgesäten Zellen direkt proportional zur Anzahl der sich entwickelnden Kolonien ist. Entsprechende Versuche wurden mit den Zellinien gemacht und in 3.1 dargestellt.

2.2.6.4. Umweltbedingungen

Optimales Wachstum hängt entscheidend von der Nährlösung ab. Um möglichst konstante Bedingungen zu erreichen, bezog ich sie immer von den gleichen Firmen. Die Qualität des FKS wechselte dennoch sehr stark. Mit wechselnder FKS - Qualität war die Kolonieausbeute im Agar deutlich verschieden (s. 3.2 B).

Bei der Monolayer-Methode fiel auf, daß sich die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen auf verschiedenen Platten oft erheblich unterschied. Die gleichen Ansätze wurden deshalb auf verschiedene Platten verteilt und auf jeder Platte eine Kontrolle mitgeführt.

Ein weiterer Umweltfaktor sind die Brutschrankverhältnisse, die bei 37°C 5 % CO_2 und feuchtigkeitsgesättigter Luft konstant gehalten wurden. Die Zellen wurden nur kurzzeitig ausserhalb gehalten.

2.2.6.5. Interferon

Die Ablesung der Titerstufe bei der Interferonbestimmung ist nur auf 2 Stufen genau.

In der Literatur wird berichtet (100), daß Zellen höher Passagezahl unempfindlicher auf Interferon reagieren. Ich versuchte dies dadurch zu umgehen, indem ich immer wieder eingefrorene Zellen mittlerer Passagezeit auftaute und verwendete. Die Passagezahl bewegte sich bei den verschiedenen Zellinien bei mir zwischen 50 und 160.

2.2.6.6. Pipettierfehler

Pipettierfehler ergaben sich u.a. bei

der Zellverdünnung beim Versuchsansatz
der Verdünnung der Medikamente
der Medikamentenzugabe.

2.2.6.7. Bestimmung der Koloniezahl im Agar

Die Anzahl der Kolonien pro Loch wurde mit dem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. In den quantitativen Wert ging damit eine subjektive Komponente ein.

Die Abweichungen beim mehrmaligen Auszählen des gleichen Lochs waren $< 5\ \%$.

Je nach Zellinie und Qualität des FKS entwickelten sich in der Kontrolle 1 800 bis 2 700 Kolonien pro Loch.

Um zufällige Fehler zu minimieren, wurde im Versuchsablauf jeder Handgriff möglichst standardisiert.

Systematische Fehler versuchten wir im Labor durch gegenseitige Kontrolle zu vermeiden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Ausbeute an Kolonien bei der Agar-Methode

Von den ausgesäten Zellen bildet nur ein Teil Kolonien. Die Zahl und die Größe der Kolonien wird bestimmt durch die dem Test eigene Ausbeute an Kolonien ("intrinsic cloning efficiency"), durch die Wachstumsrate der Zellen und durch die Medikamente, die auf die Lebendigkeit und Teilungsfähigkeit der Zellen wirken (6).

Die Kolonieausbeute ("cloning efficiency") betrug 3 - 6 % der ausgesäten, unbehandelten Zellen.

Für die dem Test eigene Kolonieausbeute war die Qualität des FKS der maßgebende Faktor. Bei der schlechtesten FKS - Charge bildeten sich keine Kolonien; die Zellen teilten sich nur 3 oder 4 mal.

Photo 3a und 3b zeigen die unterschiedliche Anzahl und Grösse der Kolonien bei der IMR - 32 - Zellinie beim selben Versuch mit verschiedenen FKS - Chargen (alle anderen Parameter waren gleich).

Die höchste Ausbeute an Kolonien wurde erreicht, wenn anstatt tiefgefroren gelagertem, inaktiviertem FKS dieselbe Menge an frischem menschlichen Serum (für 1/2 h bei 56°C inaktiviert) verwendet wurde.

Die von mir verwendete quantitive und statistische Auswertung der Versuche ist nur dann erlaubt, wenn die pro Loch ausgesäte Zellzahl direkt proportional der pro Loch entstehenden Koloniezahl ist.

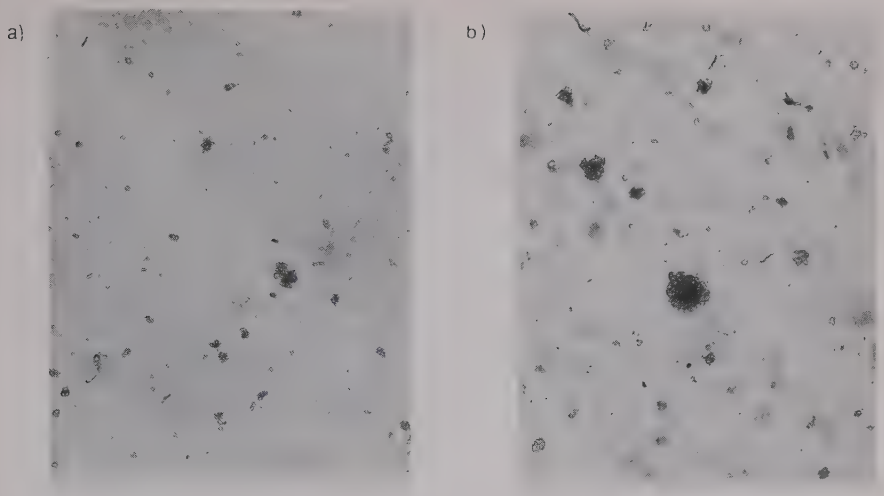


Photo 3: IMR - 32 a) und b) zeigen denselben Versuch (Agar - Methode)
a) schlechte FKS - Charge
b) gute FKS - Charge
Vergrößerung 40 x

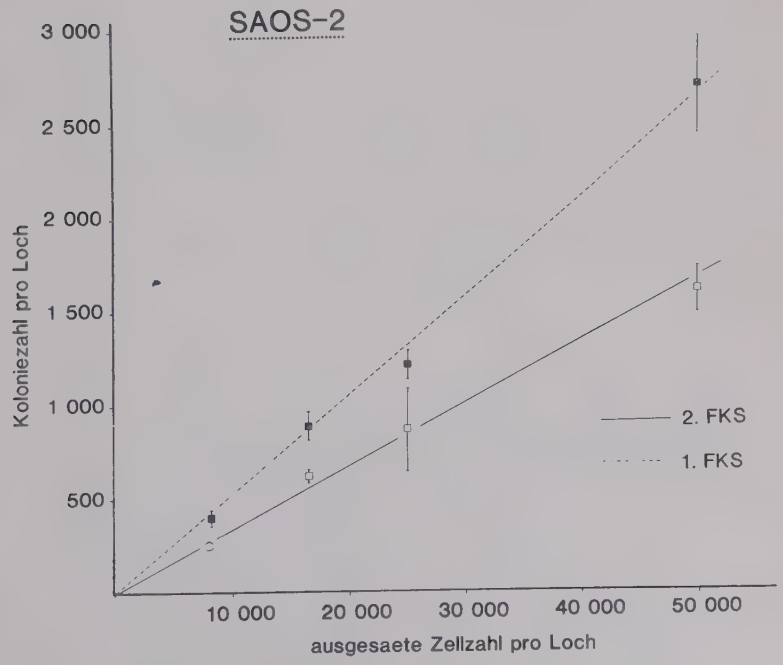


Abb.: 3 Abhängigkeit der Kolonienausbeute von der ausgesäten Zellzahl bei 2 verschiedenen FKS - Chargen im semisoliden Agar

Abbildung 3 zeigt die entsprechenden Ergebnisse für die SAOS - 2 Zellinie bei 2 verschiedenen Seren im Medium.

Für das 1. FKS wurde folgende Regressionsgerade errechnet: $y = 0,05x - 64$ [1] mit einem empirischen Korrelationskoeffizienten von $r = + 0,97$ [2].

Für das 2. FKS war $y = 0,03x + 49$ und $r = + 0,98$.

Mit einem Korrelationskoeffizienten von + 0,97 bzw. + 0,98 ist die pro Loch erhaltene Koloniezahl mit hoher Wahrscheinlichkeit linear von der pro Loch ausgesäten Zellzahl abhängig.
Bei den anderen verwendeten Zellinien ergab sich die gleiche Abhängigkeit.

3.2. Reproduzierbarkeit des Interferon - Effektes bei derselben Zellinie

Abb. 4 zeigt den Vergleich des Dosis - Wirkungs - Kurvenverlaufs bei zwei verschiedenen Versuchen mit derselben Zellinie SK - N - FI.
Die Versuche wurden in einem Abstand von 2 Monaten durchgeführt. Der zeitlich spätere Versuch war der mit Passage 84. Die vorher in flüssigem Stickstoff bei Passage 80 gelagerten Neuroblastomzellen wurden 2 Wochen vor Versuchsbeginn aufgetaut und im Monolayer gehalten.
Die beiden Kurven verlaufen ähnlich.

[1] Die Steigung m der Geraden $y = mx + b$ entspricht der "cloning efficiency"

[2] wobei $-1 \leq r \leq +1$; $r = 0$: keine Korrelation
$r = +1$: Punkte liegen auf einer Geraden mit positiver Steigung
$r = -1$: Punkte liegen auf einer Geraden mit negativer Steigung

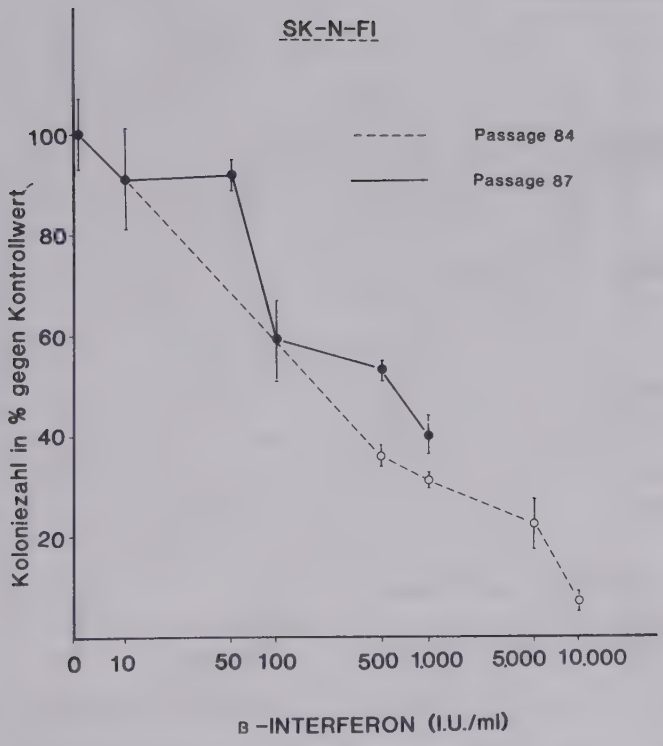


Abb. 4 : Verlauf der Dosiswirkungskurven bei zwei verschiedenen Versuchen mit derselben Zellinie im Vergleich. (Agar - Methode)

3.3. Vergleich der Zellinien in ihrer Empfindlichkeit gegenüber der Dauerexposition mit Interferon - β

3.3.1. Agar-Methode

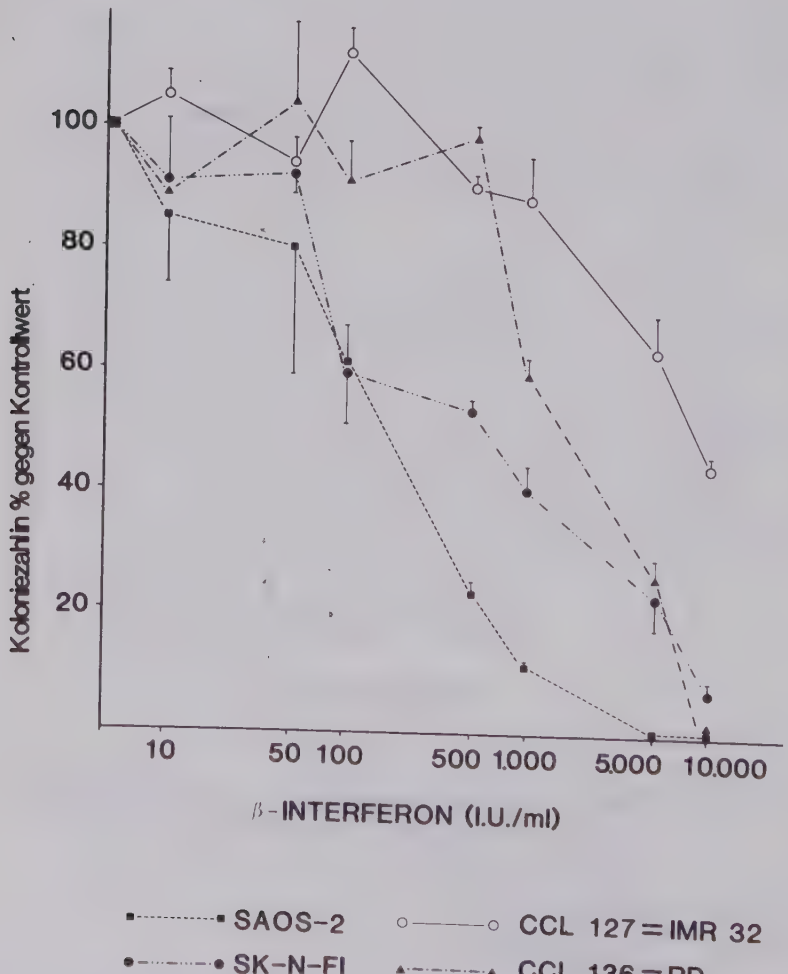


Abb.: 5 Dosiswirkungskurven der 4 Zellinien gegen Interferon - β mit der Agar-Methode. Ausgangszellzahl 5×10^4/Loch

3.3.2. Monolayer-Methode

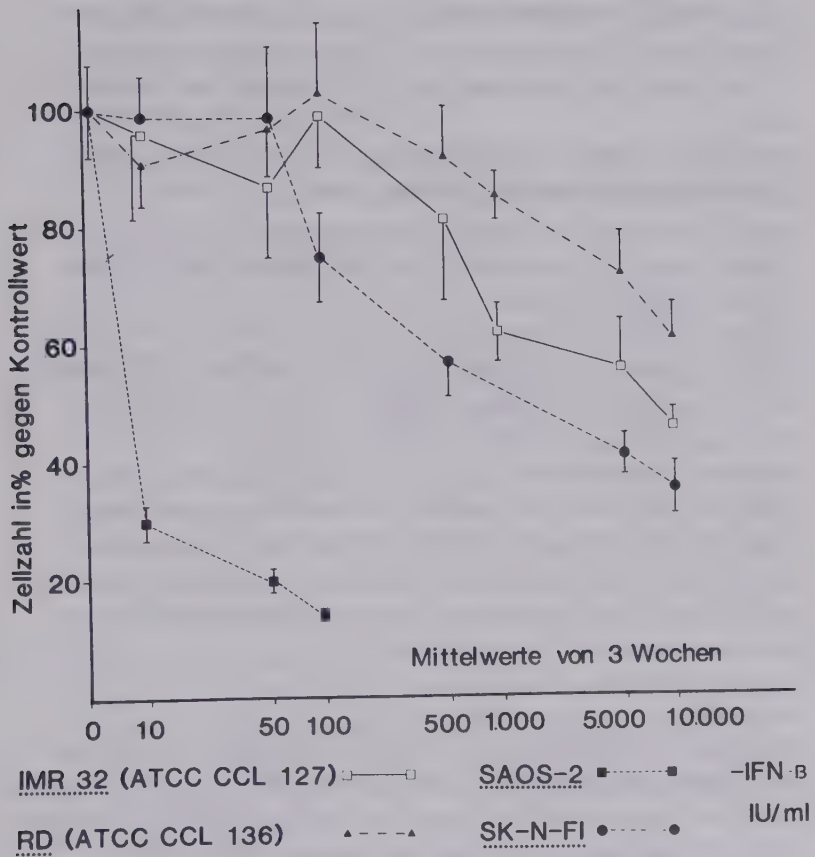


Abb.: 6 Dosiswirkungskurven der 4 Zellinien gegen IFN - β mit der Monolayer - Methode. Ausgangszellzahl 10^5 Zellen/Loch (Ergebnisse von MANFRED DILGER)

Zu 3.3.1.

Bei der kolonienbildenden Methode (Abb.5) ist wie bei der Monolayer - Methode die SAOS - 2 Linie die empfindlichste der vier untersuchten Zellinien. Bei Dauer - Exposition mit 10 I.U./ml IFN - ß fällt die Koloniezahl auf 85 % gegenüber der Kontrolle ab.

Der 50 I.U./ml IFN - ß - Wert hat mit $\pm$ 21 % die größte korrigierte Standardabweichung dieser Arbeit.

Bei 100 I.U./ml IFN - ß beträgt die Koloniezahl 61 %, bei 1 000 I.U./ml 11 %, und bei 5 000 und 10 000 I.U./ml bilden sich keine Kolonien mehr.

Von den beiden Neuroblastomzellinien ist die SK - N - FI - Linie wie bei a) die empfindlichere. Sie fällt schon bei 100 I.U./ml IFN - ß auf 59 % ab, wogegen die IMR - 32 Zellinie eindeutig erst bei 5 000 I.U./ml IFN - ß (63 %) reagiert.

Die Rhabdomyosarkomlinie ist bei 500 I.U./ml gegenüber IFN - ß resistent und fällt bei 1 000 I.U./ml auf 60 % Kolonien gegenüber der Kontrolle ab. Bei 10 000 I.U./ml IFN - ß werden nur noch 1 % Kolonien gegenüber der Kontrolle gebildet. Die bei hohen Interferondosen erhaltenen Kolonien waren kleiner als die Kontrollkolonien.

Zu 3.3.2.

In Abb. 6 fällt zunächst die extreme Empfindlichkeit der osteogenen Sarkomzellinie SAOS - 2 auf. Bereits bei 10 I.U./ml IFN - ß sinkt die Zellzahl auf 25 % gegenüber dem Kontrollwert ab. Das ist ein geringerer Wert als bei den drei anderen Zellinien bei 10 000 I.U./ml erreicht wurde.

Von den drei anderen Zellinien, deren Kurvenverlauf bei halblogarithmischer Darstellung fast parallel ist, ist die Neuroblastomlinie SK - N - FI die nächst empfindlichere.

Ab 100 I.U./ml IFN - ß mit einer Zellzahl von 75 % fällt sie dann über 57 % bei 500 I.U./ml auf 35 % bei 10 000 I.U./ml ab.

Die andere Neuroblastomlinie IMR - 32 fällt deutlich erst bei der 10 fachen Interferon - Konzentration ab, nämlich ab 1 000 I.U./ml IFN - ß. Bei 10 000 I.U./ml beträgt die Zellzahl nach 3 Wochen noch 55 % gegenüber dem Kontrollwert.

Bei dem Monolayer - Versuch ist die Rhabdomyosarkomlinie RD am unempfindlichsten gegenüber IFN - ß. Ihre Zellzahl sinkt bei 1 000 I.U./ml leicht ab. Über 72 % bei 5 000 I.U./ml erreicht sie bei 61 % bei einem Interferon - Spiegel von 10 000 I.U./ml.

3.3.3. Vergleich der Ergebnisse

Das Interferon wurde bei der Monolayer - Methode in jeder der drei Wochen für 4 Tage jeweils neu dem Medium zugefügt.

Bei der kolonienbildenden Methode war die Interferon - Lösung Bestandteil des Upper-Layers.

Bei beiden Methoden ist die Osteosarkomlinie SAOS - 2 die empfindlichste Zellinie. Beides mal beginnt der Abfall schon bei 10 I.U./ml IFN - ß. Jedoch scheint diese Zellinie bei der Monolayer - Methode im Verhältnis zu den anderen Zellinien stärker gehemmt zu werden.

Von den beiden Neuroblastomzellinien ist bei beiden Methoden die SK - N - FI - Linie die empfindlichere. (Abfall ab 100 I.U./ml IFN - ß), die IMR - 32 - Linie die resistentere (Abfall bei 1 000 I.U./ml bzw. 5 000 I.U./ml IFN - ß).

Die Rhabdomyosarkomlinie RD ist beides mal relativ resistent (Abfall ab 1 000 I.U./ml IFN - ß). Jedoch ist sie in der Monolayer - Methode im Gegensatz zur Agarmethode unempfindlicher wie die IMR - 32 - Zellinie. Bei der kolonienbildenden Methode fällt die RD - Linie bei hohen Interferonkonzentrationen relativ steil ab.

Für die Versuche mit verschiedenen anderen Interferonen (3.5), sowie mit Mock - Interferon (3.4) und für die Zeitversuche mit IFN - ß (3.6) wurden die gegen IFN - ß sehr sensible SAOS - 2 Linie und die relativ resistente IMR - 32 - Zellinie verwendet.

3.4. Wachstumshemmende Wirkung der MOCK-Präparation
(wärmeinaktiviertes IFN - B)

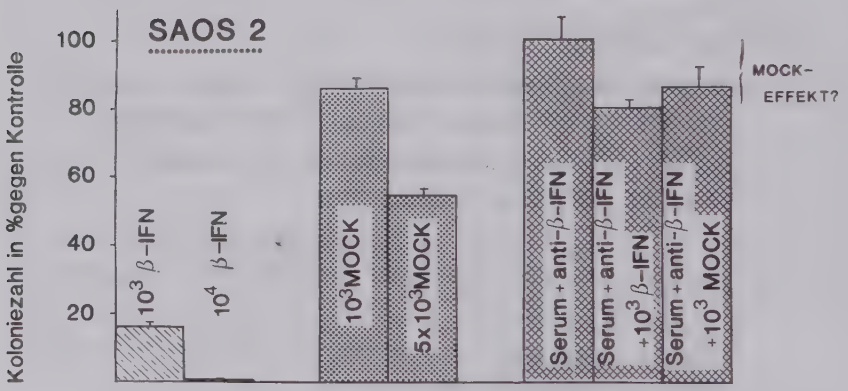


Abb.: 7 Antiproliferativer Effekt von IFN - B und Mock - IFN und ihre Kombination mit anti - IFN - B - Serum

Abb. 7 zeigt die Ergebnisse bei der SAOS - 2 - Zellinie.
Bei 1 000 I.U./ml IFN - B bilden sich noch 16 % der Kolonien des Kontrollwertes. Bei 5 000 I.U./ml IFN - B bilden sich keine Kolonien mehr.
1 000 I.U./ml Mock - IFN führen zu 85 %, 5 000 I.U./ml Mock - IFN zu 56 % Kolonien gegenüber der Kontrolle.
Die Zugabe von humanem Serum mit Antikörpern gegen IFN - B* zusammen mit 1 000 I.U./ml IFN - B führt nicht zu einer Koloniezahl von 100 % gegenüber der Kontrolle sondern zu 81 %. Die Kontrolle erhielt die gleiche Menge an Antikörperserum.
Humanes Serum mit Antikörpern gegen IFN - B zusammen mit 1 000 I.U./ml Mock - IFN bildet 86 % Kolonien gegenüber der Kontrolle aus.

* 1 ml Serum inaktiviert 10^4 I.U./ml IFN - B

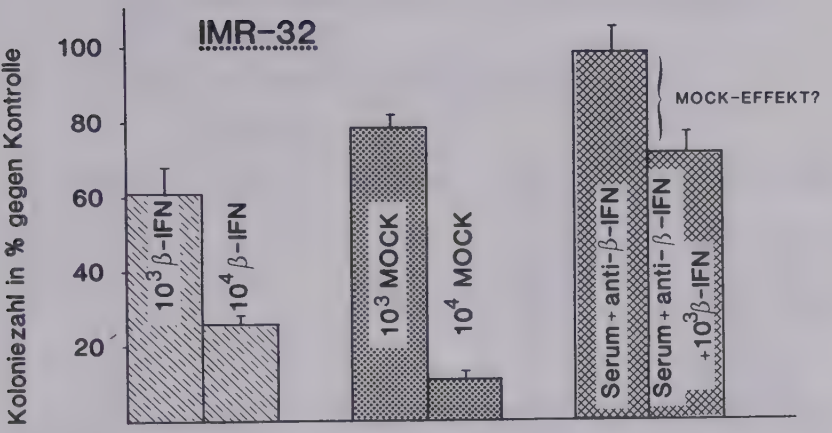


Abb.: 8 Antiproliferativer Effekt von IFN - B und Mock - IFN und ihre Kombination mit anti - IFN - B - Serum

Die IMR - 32 - Zellinie (Abb. 8) ist nicht so empfindlich gegenüber IFN - B wie die SAOS - 2 - Zellinie (siehe 3.4.). 1 000 I.U./ml IFN - B führen zu 62 %, 10 000 I.U./ml IFN - B zu 29 % Kolonienwachstum.

1 000 I.U./ml Mock - IFN führen zu einer Koloniezahl von 79 %, 10 000 I.U./ml zu 12 % gegenüber der Kontrolle.

Nach Zugabe von humanem Serum mit Antikörpern gegen IFN - B zusammen mit 1 000 I.U./ml IFN - B bilden sich 72 % Kolonien gegenüber dem Kontrollwert, der Serum mit Antikörpern und kein Interferon enthält.

3.4.2. Vergleich mit den Ergebnissen der Monolayermethode

Die folgende Tabelle vergleicht die wachstumshemmende Wirkung des Mock - Interferon bei der Agarmethode mit der Wirkung bei der Monolayermethode (DILGER).

	SAOS - 2		IMR - 32	
MOCK - IFN	Agar	Monolayer	Agar	Monolayer
500 I.U./ml		99 %		98 %
1 000 I.U./ml	80 %	86 %	89 %	79 %
5 000 I.U./ml	56 %	45 %		51 %

Bei beiden Linien und bei beiden Methoden ist der wachstumshemmende Mock - Effekt qualitativ und quantitiv gleich stark ausgeprägt. Er beginnt bei einer Mock - IFN - Konzentration, die 1 000 I.U./ml IFN - B entspricht und ist bei 5 000 I.U./ml deutlich ausgeprägt.

3.5. Vergleich des antiproliferativen Effektes von alpha, beta und gamma Interferonen

3.5.1. Vergleich von alpha und beta Interferonen

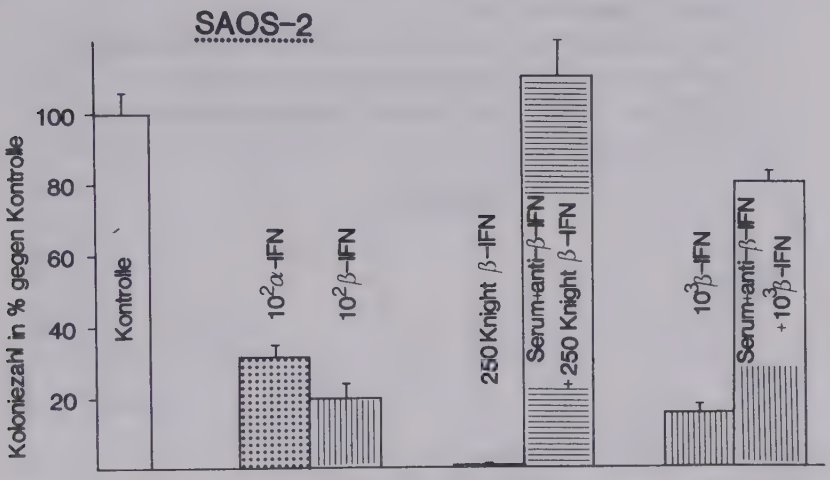


Abb.: 9 Antiproliferativer Effekt der Interferonsorten von Cantell, Knight und der Firma Rentschler. Kombination von Knight und Rentschler IFN - B mit anti - IFN - B - Serum. IFN-Angaben in Internationalen Einheiten

Abb. 9 zeigt die Ergebnisse der kolonienbildenden Methode bei der interferonsensiblen SAOS - 2 - Linie.

Wie bei der Monolayer - Methode wirkt bei 100 I.U./ml das Cantell'sche IFN - α (Abfall auf 31 %) schwächer als das IFN - B der Firma Rentschler (Abfall auf 20 %).

Beim hochgereinigten IFN - B (Knight) bilden sich bei 250 I.U./ml keine Kolonien mehr. Es wirkt damit wesentlich stärker als das Rentschler'sche IFN - B (bei 1 000 I.U./ml Abfall auf 15 %)

Die antiproliferative Wirkung des Knight'schen IFN - B wird durch Zugabe von humanem Serum, das Antikörper gegen IFN - B enthält, völlig aufgehoben (110 % $\pm$ 10 % Kolonien gegenüber Kontrolle).

Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von Serum mit den Antikörpern beim Rentschler'schen IFN - B nicht zu einer Koloniezahl um 100 % gegenüber der Kontrolle, sondern zu einer Koloniezahl von 81 % $\pm$ 3 %.

(Siehe hierzu auch 3.4.)

Es wurde 10 mal soviel Serum im Ansatz verwendet, wie zur völligen Neutralisation des IFN - B nötig ist.

3.5.2. Vergleich von beta mit gamma Interferon

Den Vergleich der Wirkung von Interferon - γ gegenüber Interferon - B bei der interferonsensiblen SAOS - 2 Zellinie zeigt Abb. 10.

IFN - γ bewirkt bei 2,5 I.U./ml schon einen eindeutigen Abfall auf 73 % der Kolonien gegen den Kontrollwert. 25 I.U./ml IFN - γ (35 %) wirken stärker als 100 I.U./ml IFN - B (61 %).

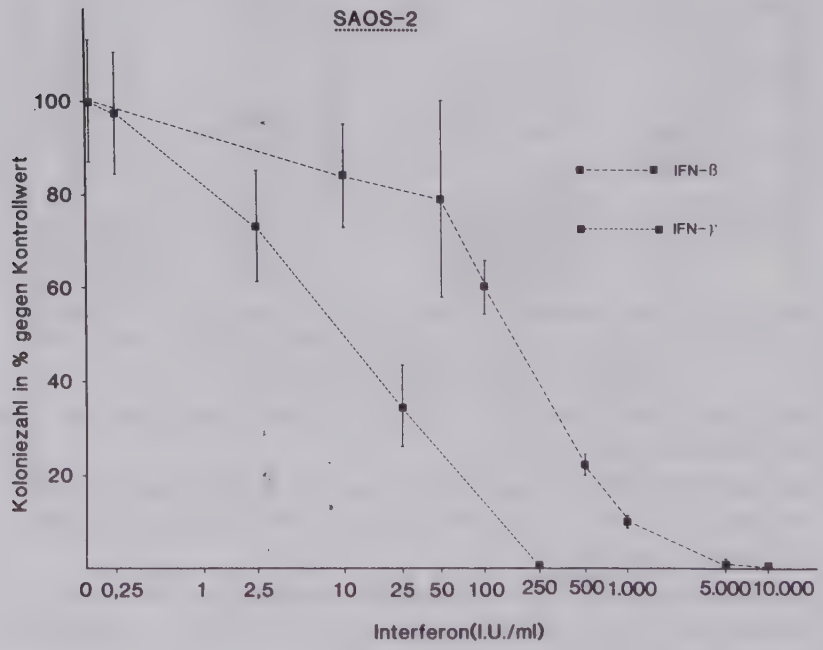


Abb.: 10 Antiproliferativer Effekt von IFN - B und IFN - γ (Agar - Methode)

Bei 250 I.U./ml IFN - γ werden keine Kolonien mehr gebildet. Die gleiche Wirkung wird mit IFN - B erst mit 5 000 I.U./ml erreicht.

Die 250 I.U./ml IFN - γ entsprechende Menge "Inducer für IFN - γ " zeigt keinen Effekt (102 % ± 7 % Kolonien gegen Kontrolle).

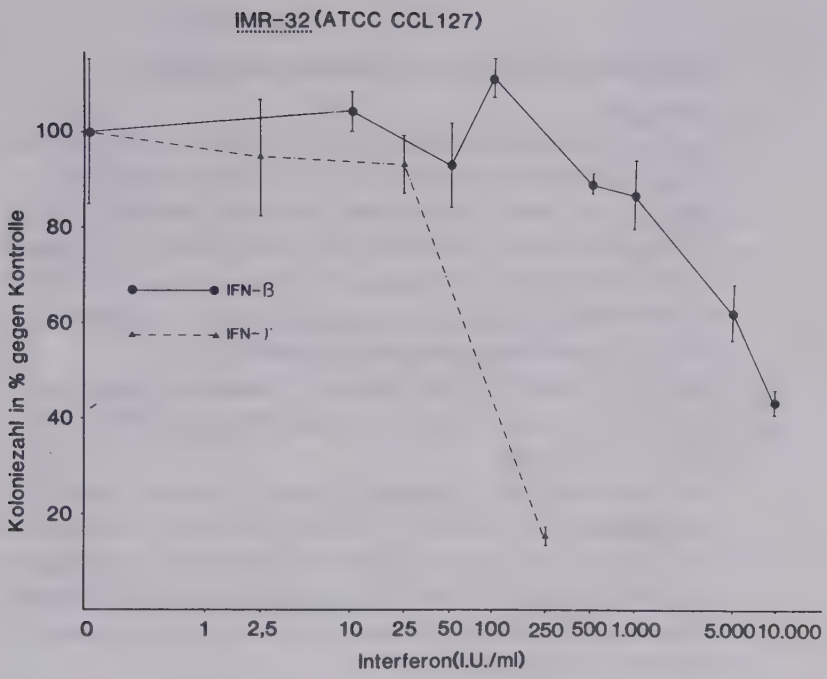


Abb.: 11 Antiproliferativer Effekt von IFN – B und IFN – γ (Agar – Methode)

Abbildung 20 b zeigt denselben Vergleich bei der IMR – 32 – Zellinie. 2,5 und 25 I.U./ml IFN – γ führen zu keinem Abfall der Koloniezahl. 250 I.U./ml IFN – γ zeigen dann mit einem Abfall auf 15 % eine stärkere Wirkung als 10 000 I.U./ml IFN – B (44 %).

Die 250 I.U./ml IFN – γ entsprechende Inducermenge zeigt wie bei der SAOS – 2 – Linie keinen wachstumshemmenden Effekt.

3.6. ZEITBEGRENZTE INTERFERON - EXPOSITION DER ZELLINIEN

3.6.1. Agarmethode

Bei den Zeitversuchen wurden die Zellen für 10', 30', 60' und 120' mit Interferon inkubiert, danach gewaschen und im Agar ausgesät. Die jeweils mitlaufende Kontrolle wurde auf dieselbe Art behandelt, statt Interferon war jedoch HBSS im Inkubationsmedium. Die Zellen der Dauerexposition wurden wie der 60'-Wert mit Interferon behandelt, der Upperlayer enthielt jedoch zusätzlich die entsprechende Menge Interferon.

Abb. 12b und Abb. 12c unten zeigen 2 x denselben Versuch mit der SAOS - 2 Linie. Beides Mal wurden die Zellen 100 I.U./ml IFN - B ausgesetzt.

Beim Versuch der Abb. 12b wurden die Zellen vor dem Aussäen zentrifügiert (10', 800 min^{-1}) und der Überstand abgezogen. Bereits die 10' - Exposition zeigte mit einem Abfall der Koloniezahl auf 66 % eine antiproliferative Wirkung, die in derselben Grössenordnung lag wie die Interferonwirkung bei Dauerexposition (Abfall auf 58 %).

Nach der jeweiligen Expositionsdauer wurden die Zellen im in Abb. 12c unten dargestellten Versuch jedoch 2 x gewaschen (10', 1 200 min^{-1}). Die vorher voll wirksame 10' Interferonexposition reichte jetzt ebensowenig wie die 120' Expositionsdauer aus, die Anzahl der Kolonien gegenüber der Kontrolle zu senken. IFN - α zeigte dieselbe Wirkung wie IFN - B.

Die Zellen der RD - Linie (Abb. 13 unten) wurden mit 1 000 I.U./ml IFN - B inkubiert und danach 2 x gewaschen (10', 1 200 min^{-1}). Ein deutlich antiproliferativer Effekt trat erst bei der Dauerexposition auf.

Zellen der gegen Interferon relativ unempfindlichen IMR - 32 Zellinie wurden mit 5 000 I.U./ml IFN - B inkubiert und danach ebenfalls 2 x gewaschen (10'. 1 200 min^{-1}). Die 10 - 120 minütige Inkubation mit IFN - B zeigte wieder keinen antiproliferativen Effekt.

5 000 I.U./ml IFN - α wirkten gleich wie dieselbe Menge IFN - B (in keiner Abb. dargestellt).

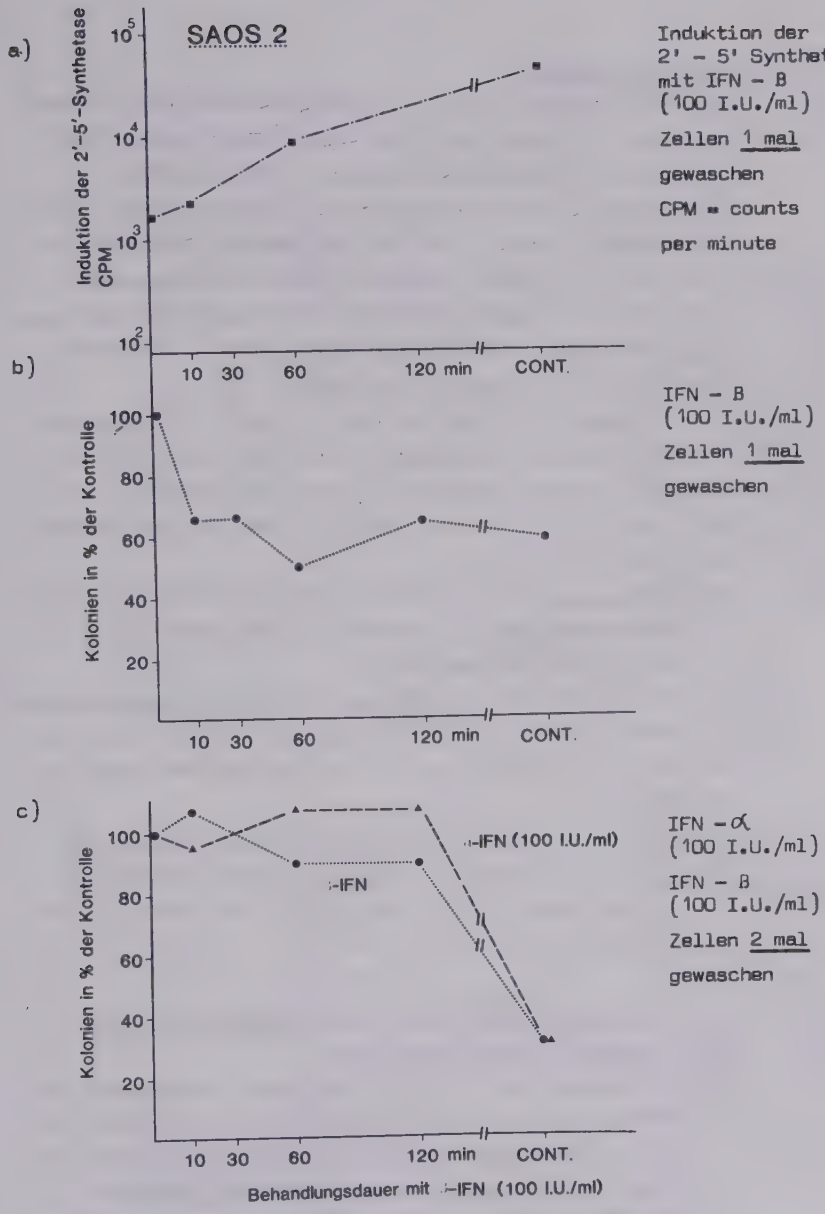


Abb.: 12 Auswirkung der Expositionsdauer von IFN auf
a) die Induktion der 2' - 5' Synthetase
b) und c) die Reduktion der Koloniezahl

3.6.2. 2' - 5' Synthetase

Der Aktivitätsgrad der (2' - 5') Oligoisoadenylatsynthetase entspricht dem durch Interferon induzierbaren antiviralen, nicht dem antiproliferativen Status der Zellen (88).
Jeweils 500 000 Zellen wuchsen für 24 h als Monolayer in Kulturflaschen an, wurden dann für die jeweilige Zeit einem interferonhaltigen Medium ausgesetzt, das danach abgewaschen wurde. Einen Tag später wurden die Zellen durch Trypsinierung abgelöst und danach der Aktivitätsgrad der 2' - 5' Synthetase bestimmt[1]. Verfahren beschrieben in (30).
Abb. 12a zeigt die Ergebnisse bei der SAOS - 2 Linie nach der Exposition mit 100 I.U./ml IFN - B. Die Aktivität der 2' - 5' Synthetase stieg kontinuierlich an (Kontrolle 1 070 CPM[2]; nach 10' 2 354 CPM, nach 60' 8 936 CPM, bei Dauerexposition 48 129 CPM).
Mit 1 000 I.U./ml IFN - B stieg die Aktivität der 2' - 5' Synthetase bei der SAOS - 2 bereits nach 10' auf 25 114 CPM (nicht graphisch dargestellt).
Die RD - Linie (Abb. 13 oben) wurde mit 1 000 I.U./ml IFN - B inkubiert. Nach 10' war die Wirkung mit 55 850 CPM schon halb so hoch wie nach Dauerexposition mit 103 489 CPM (Kontrolle 145 CPM).
Die Zellen der IMR - 32 Linie (Abb. 14 oben) wurden 5 000 I.U./ml IFN - B ausgesetzt. Nach 10' war die Aktivität der 2' - 5' Synthetase von 365 CPM auf 61 355 CPM gestiegen. Die Dauerexposition zeigte 80 425 CPM.

3.6.3. Vergleich der Ausbildung des antiproliferativen gegenüber dem "antiviralen Status" der Zellen

Nach zweimaligem Waschen wirkte Interferon bei der semisoliden Agarmethode in den genutzten Konzentrationen bei den getesteten Zellinien auch nach 2 h Exposition noch nicht antiproliferativ. Die jeweils entsprechende Menge Interferon führte jedoch bereits nach 10' zu einem Anstieg der Aktivität der 2' - 5' Synthetase.

1. Die Messung der Synthetaseaktivität wurde freundlicherweise von Frau cand. med. IRENE THOMAE durchgeführt.
2. CPM = counts per minute im Szintillationszähler

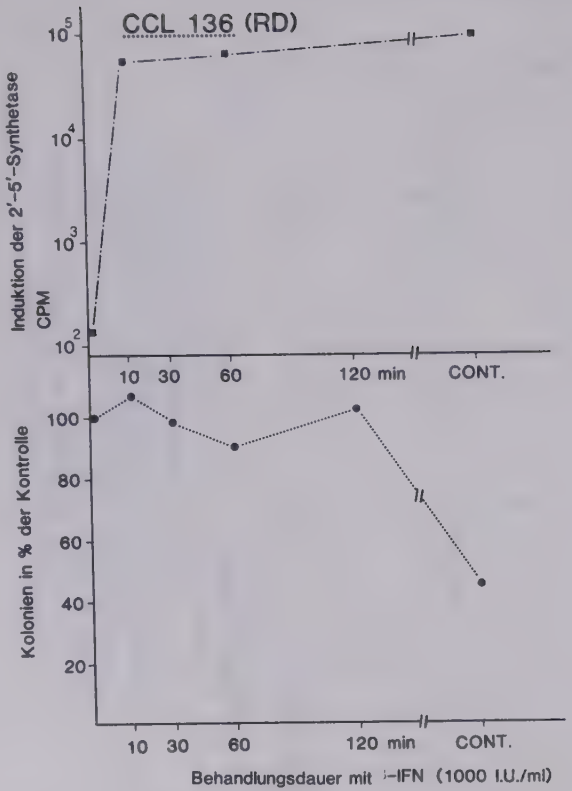


Abb.: 13 Auswirkung der Expositionsdauer auf die Induktion der 2' - 5' Synthetase (oben) und die Reduktion der Koloniezahl (unten) Zellen 2 mal gewaschen

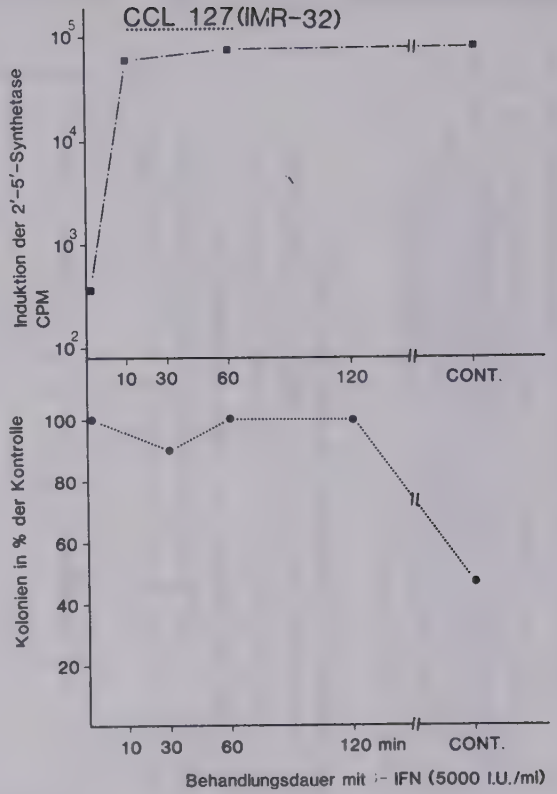


Abb.: 14 Auswirkung der Expositionsdauer auf die Induktion der 2' - 5' Synthetase (oben) und die Reduktion der Koloniezahl (unten) Zellen 2 mal gewaschen

3.7. Antiproliferativer Effekt verschiedener Zytostatika

Die Zellen wurden bei der Monolayer-Methode 24 Stunden lang der 10 - fach niedrigeren und der höchsten therapeutisch in vivo im Serum nachzuweisenden Zytostatikakonzentration (Peak-Konzentration, siehe Tab. Seite 10) ausgesetzt. Bei der Agar - Methode wurden die Zellen mit 10 mal, 1 mal und 1/10 mal Peak-Konzentration für 1 Stunde inkubiert und danach im Agar ausgesät.

3.7.1. Ergebnisse bei der osteogenen Sarkomlinie SAOS - 2

Die Zellen wurden Actinomycin D, Adriamycin, Methotrexat, Cis - platinum und VP - 16 ausgesetzt. Actinomycin D, Adriamycin, Methotrexat, Cis- platinum werden bei der z.Z. laufenden klinischen osteogenen Sarkomstudie COSS 80 eingesetzt. Die Abbildungen 15 und 16 zeigen die Ergebnisse.

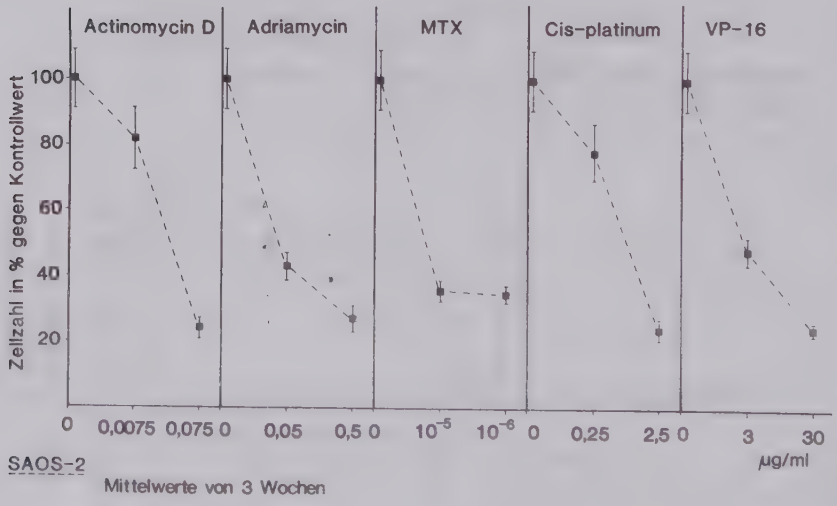


Abb.: 15 Wachstum der SAOS - 2 Zellen nach 24 h Zytostatikaexposition in Abhängigkeit der Konzentration (Monolayerverfahren)
Die Konzentration von MTX ist in mol/l angegeben, die der anderen Zytostatika in ug/ml

Mit zunehmender Zytostatikakonzentration zeigt sich bei beiden Methoden eine deutliche Wirkungssteigerung. Die Zellen sind gegenüber allen Zytostatika sensibel.

Bei der Monolayer - Methode (24 h Exposition) ist die 1/10 "Peak"-Konzentration wirksamer als bei der Kolonien bildenden Methode (1 h Exposition). Diese Konzentration wirkte im Agar bei Actinomycin D, Adriamycin und Cis - platinum nicht.

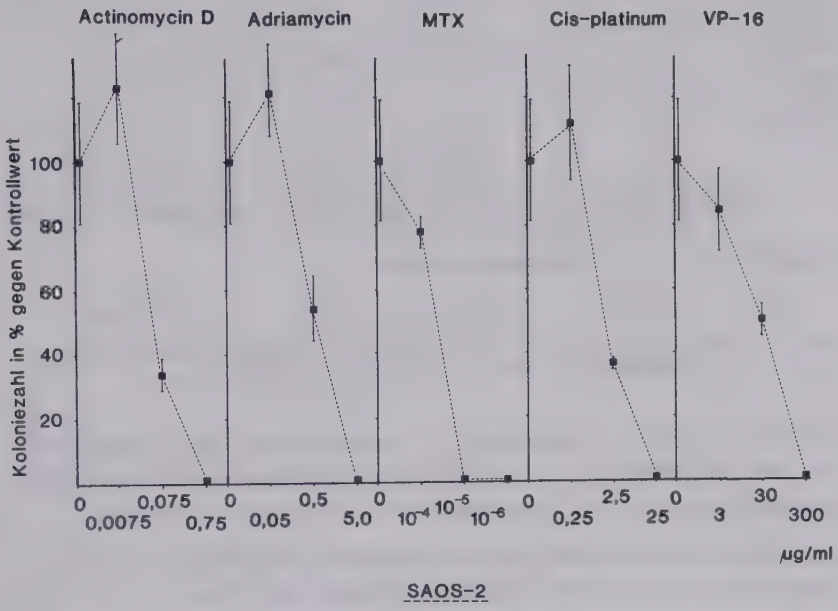


Abb.: 16 Wachstum der SAOS - 2 Zellen nach 1 Stunde Zytostatikaexposition in Abhängigkeit von der Konzentration (Agarmethode)
Die Konzentration von MTX ist in mol/l angegeben, die der anderen Zytostatika in ug/ml

3.7.2. Ergebnisse bei der Rhabdomyosarkomlinie RD

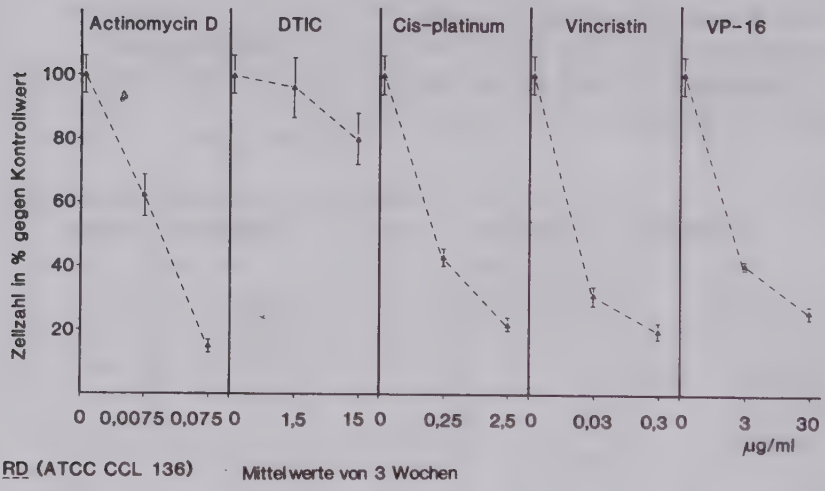


Abb.: 17 Wachstum der RD - Zellen nach 24 h Zytostatikaexposition in Abhängigkeit der Konzentration (Monolayer)

Die Zellen wurden mit Actinomycin D, Cis - platinum, DTIC, Vincristin und VP - 16 behandelt. Bei der Behandlung der Rhabdomyosarkome werden u.a. Actinomycin D, Cis - platinum, DTIC und Vincristin eingesetzt.

Die Zellen sind bei beiden Methoden gegenüber Actinomycin D, Vincristin und VP - 16 viel sensibler als gegenüber DTIC.
Cis - platinum wirkt bei der semisoliden Agarmethode schlecht, hingegen bei der Monolayer - Methode gut.
Actinomycin D und Cis - platinum bei 1/10 Peak-Konzentration senken die Koloniezahl im Agar nicht.

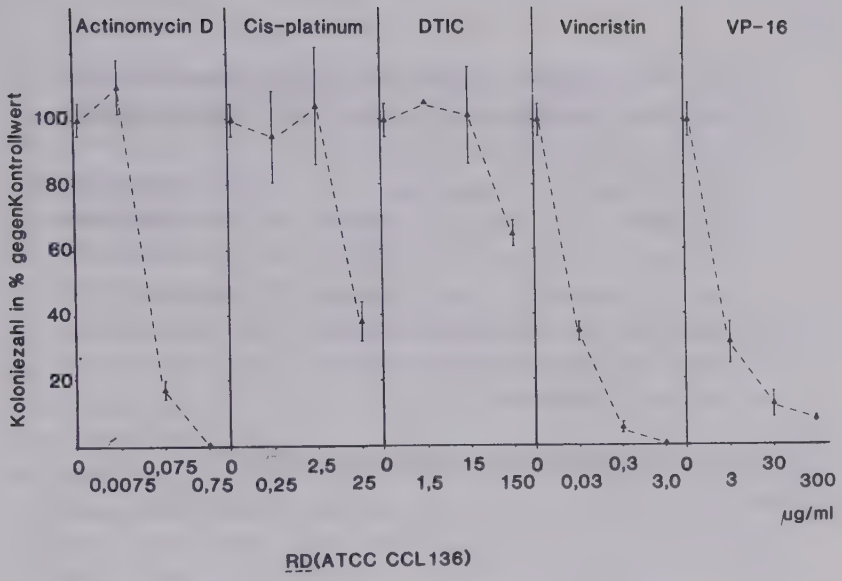


Abb.: 18 Wachstum der RD - Zellen nach 1 h Zytostatikaexposition in Abhängigkeit der Konzentration (Agarmethode)

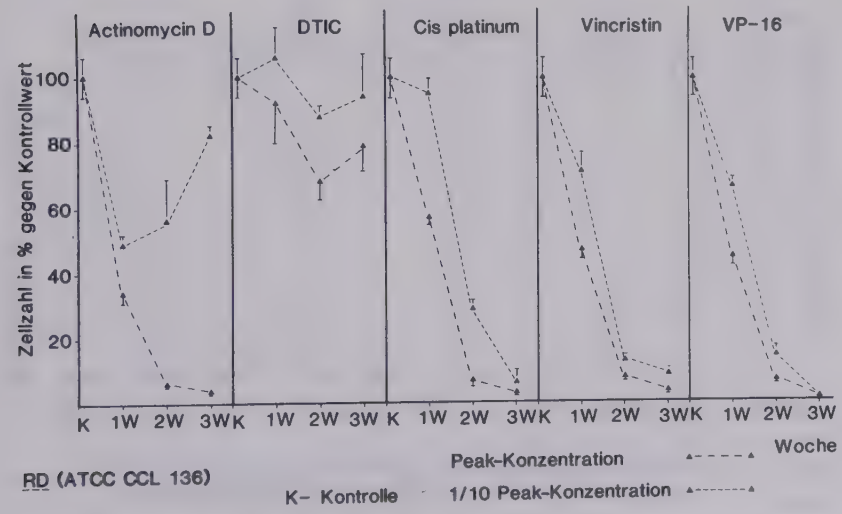


Abb.: 19 Wachstum der RD - Zellen nach 24 h Zytostatikaexposition in Abhängigkeit der Konzentration (Monolayer-Methode)

Abb. 19 zeigt das Verhalten der Rhabdomyosarkomzellen beim Monolayer-Verfahren nach einmaliger 24 h Zytostatikaexposition im Verlauf von 3 Wochen.
Die Actinomycin D ausgesetzten Zellen erholen sich relativ zur Kontrolle nach der ersten Woche bei 1/10 x "Peak-Konzentration" im Gegensatz zu 1 x "Peak-Konzentration".
Die DTIC ausgesetzten Zellen erholen sich ab der 3. Woche sogar bei 1 x "Peak-Konzentration".
Dieser Erholungseffekt tritt bei Cis - platinum, Vincristin und VP - 16 nicht auf.

3.7.3. Die Neuroblastomlinien SK - N - FI und IMR 32

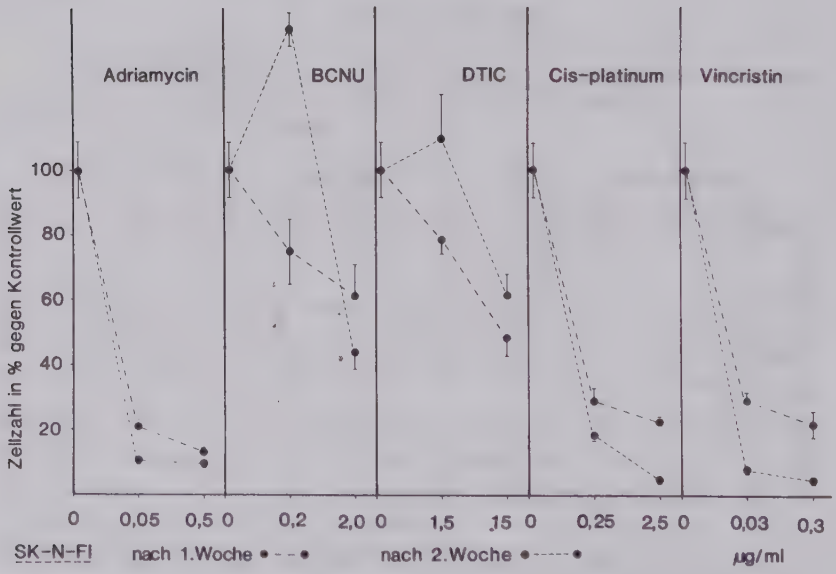


Abb.: 20 Wachstum der Zellen nach 24 h Zytostatikaexposition in Abhängigkeit der Konzentration (Monolayer-Methode)

Bei den Neuroblastomlinien wurden die Zytostatika Adriamycin, BCNU, Cis - platinum, DTIC, Vincristin und VP - 16 getestet. Adriamycin, DTIC und Vincristin werden klinisch in der z.Z. laufenden Neuroblastomstudie eingesetzt.
Bei beiden Zellinien ist die Monolayer-Methode (24 h Exposition) empfindlicher.

1) SK - N - FI (Abb. 20 und 21)
Bei beiden Methoden wurden hier dieselben Zytostatikakonzentrationsstufen (1 x und 1/10 x Peak-Konzentration) angewandt.
Adriamycin, Cis - platinum, Vincristin und VP - 16 (nur im Agar benutzt) sind hochwirksam.
DTIC ist im Agar ohne Wirkung und bei der Monolayer-Methode wie mit BCNU deutlich weniger wirksam als die anderen Zytostatika. Die Zellen erholen sich in der 2. Woche vom DTIC und BCNU bei 1/10 "Peak-Konzentration" (Abb. 20).

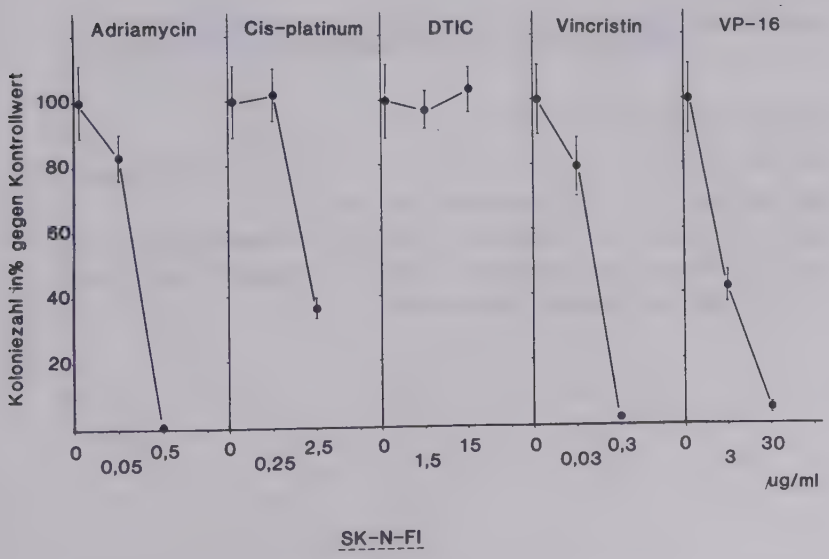


Abb.: 21 Wachstum der Zellen nach 1 h Zytostatikaexposition in Abhängigkeit der Konzentration (Agar-Methode)

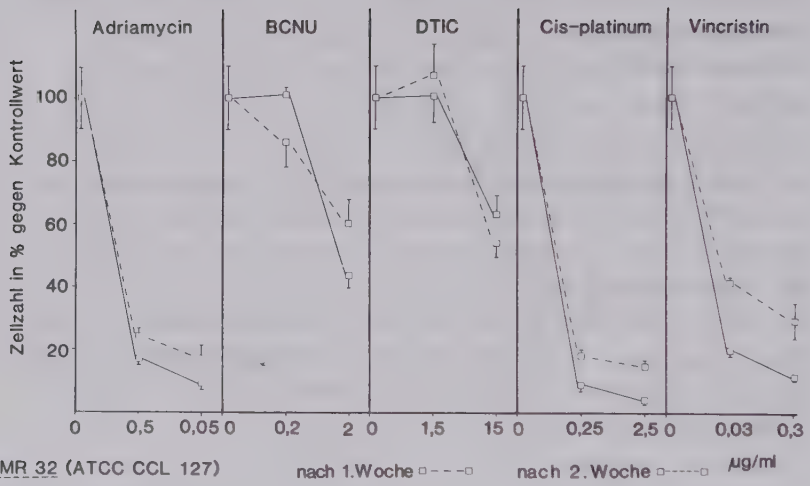


Abb.: 22 Wachstum der Zellen nach 24 h Zytostatikaexposition in Abhängigkeit der Konzentration (Monolayer - Methode)

2) IMR - 32 (Abb. 22 und 23)

Die IMR - 32 Linie ist wie die SK - N - FI Linie empfindlich gegenüber Adriamycin, Cis - platinum und Vincristin.

DTIC und BCNU haben wieder einen deutlich geringeren Effekt. Beim Monolayer erholen sich die Neuroblastomzellen wieder in der 2. Woche vom BCNU bei der niedersten Konzentration.

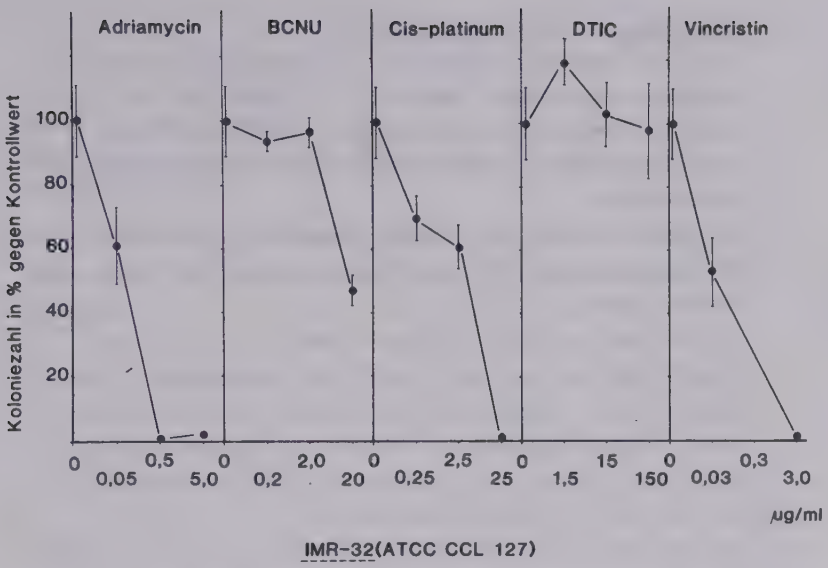


Abb.: 23 Wachstumshemmung der Zellen nach 1 h Zytostatikaexposition in Abhängigkeit der Konzentration (Agar - Methode)

3.8. Ergebnisse der Kombinationsversuche

Bei diesen Versuchen wurden die Zellen entweder nur mit beta-Interferon (Rentschler) oder nur mit Zytostatikum oder in der Kombination eines Zytostatikums mit Interferon behandelt. Die Kontrolle erhielt nur die gleiche Menge HBSS anstatt der Testsubstanzen.

Den Ergebnissen mit der Monolayer-Methode ist vorauszuschicken, daß ein Versuch 3 mal, d.h. nach der 1., 2. und 3. Woche ausgewertet wurde.

Um die Daten der Monolayer-Methode denen der Agar-Technik gegenüberstellen zu können, wurden die Resultate der 3 Wochen addiert, durch 3 geteilt und wie bei der Agar-Methode prozentual gegen die Kontrolle aufgetragen. Diese Durchschnittswerte sind in Abb. 24, 26, 28 denen der Agar-Methode in Abb. 25, 27, 29 gegenübergestellt.

Die Kombinationsversuche wurden mit Hilfe eines statistischen Testes ausgewertet (siehe S. 20). Die Größe des dadurch ermittelten U-Wertes ordnet das Ergebnis der Kombination einer in der nachfolgenden Tabelle angegebenen Kategorie zu.

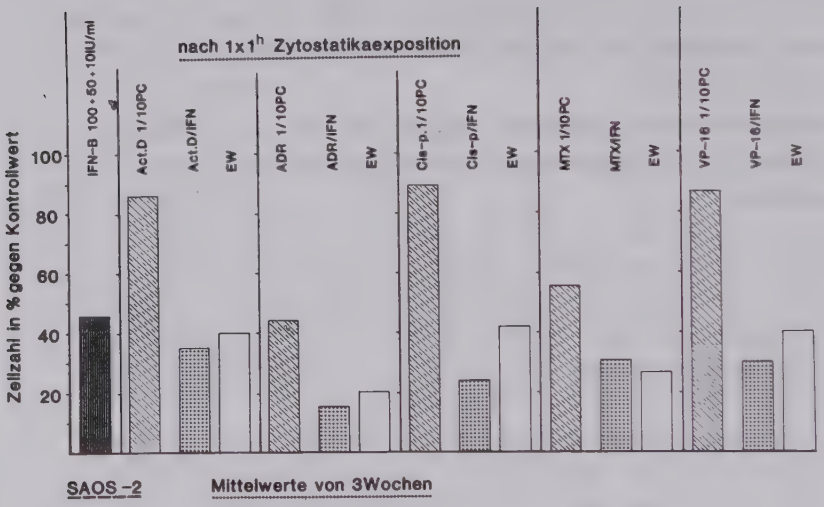
U - Wert	Kategorie	
$U < -2{,}58$	Erwartungswert signifikant unterschritten	Synergismus mit $p < 0{,}01$
$+2{,}58 \geq U \geq -2{,}58$ $U = 0$	Ergebnis im additiven Bereich = Erwartungswert	Additivität
$U > +2{,}58$	Erwartungswert signifikant überschritten	Antagonismus mit $p < 0{,}01$

Die Standardabweichungen sind weder in die Zeichnungen eingefügt, noch werden sie im Text erwähnt, da sie durch den statistischen Test in die U-Werte eingehen.

Wenn Interferon zugefügt wurde, wurde es für die gesamte Versuchsdauer zugesetzt. Dem Zytostatikum wurden die Zellen nur für eine Stunde ausgesetzt.

Die Zytostatikakonzentration richtete sich nach den Vorversuchen (siehe 3.7.) und unterscheidet sich deshalb manchmal bei den Methoden.

SAOS – 2 : (Monolayer)



Acto D	ADR	Cis-p.	MTX	VP-16
U = -1,9	- 3,2	- 6,2	+ 2,0	- 3,7

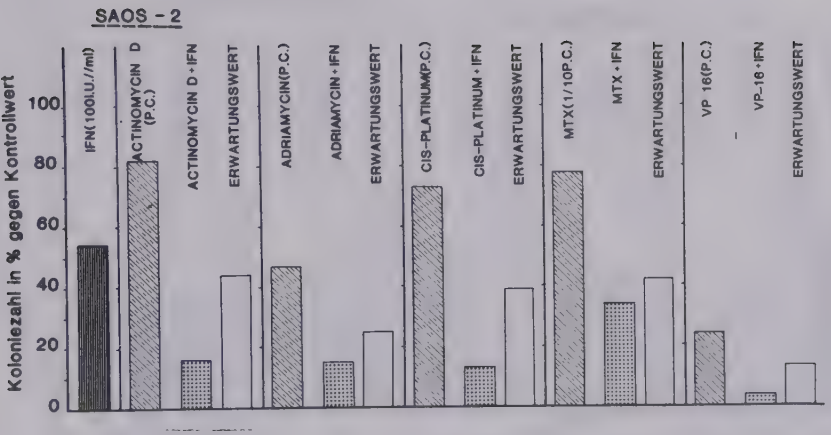
Abb.: 24 Ergebnisse der IFN-und Zytostatika - Kombinationsversuche mit der Monolayer - Methode bei der SAOS - 2 - Zellinie

Um nicht durch Interferon allein zu niedrige, nicht mehr auswertbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die Interferonbehandlung abgestuft.

Der U - Wertetabelle ist zu entnehmen, daß mit ADR, Cis-p. und VP-16 signifikant synergistische Zellreduktionen erreicht wurden. Der U - Wert von Acto D war nicht signifikant, der von MTX und IFN sogar positiv (siehe hierzu Abb. 24).

Der mit der Kombination von MTX und IFN erreichte Wert ist dennoch niedriger als der kleinste Wert bei der Einzelbehandlung.

SAOS - 2 : (Agar)



ActoD	ADR	Cis-p.	MTX	VP-16
U = -6,7	- 3,5	- 7,0	- 1,9	- 7,7

Abb.: 25 Ergebnisse der IFN-und Zytostatika - Kombinationsversuche mit der Agar - Methode bei der SAOS - 2 - Zellinie

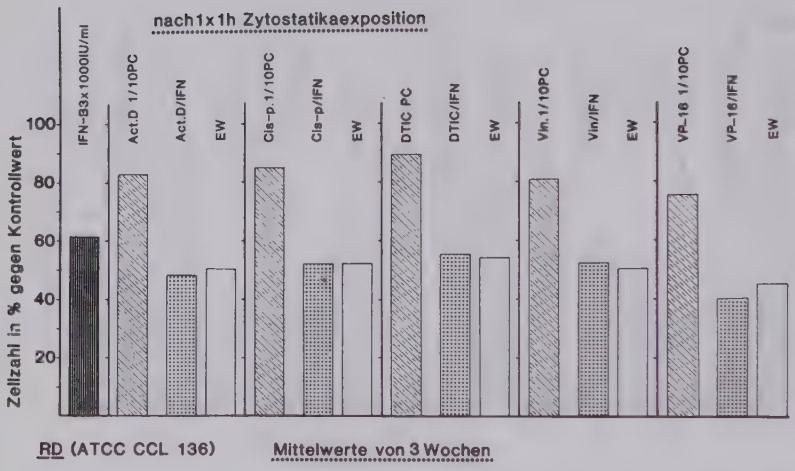
Mit allen Zytostatika (Abb. 25), mit Ausnahme von MTX und IFN wurde der Erwartungswert signifikant unterschritten (Synergismus).
Für ActoD siehe Photo 4 (Seite 59)

Vergleich der Ergebnisse bei der SAOS - 2 - Linie

Mit beiden Methoden wurden in der Kombination von IFN mit ADR, Cis-p. oder VP-16 die Erwartungswerte signifikant unterboten, bei der Agar - Methode auch mit ActoD.
Für die MTX lagen die U - Werte bei beiden Methoden im additiven Bereich.

Die Kombination war immer wirksamer als die Einzelbehandlung, bezogen auf eine 3 - wöchige Behandlungsdauer.

RD : (Monolayer)



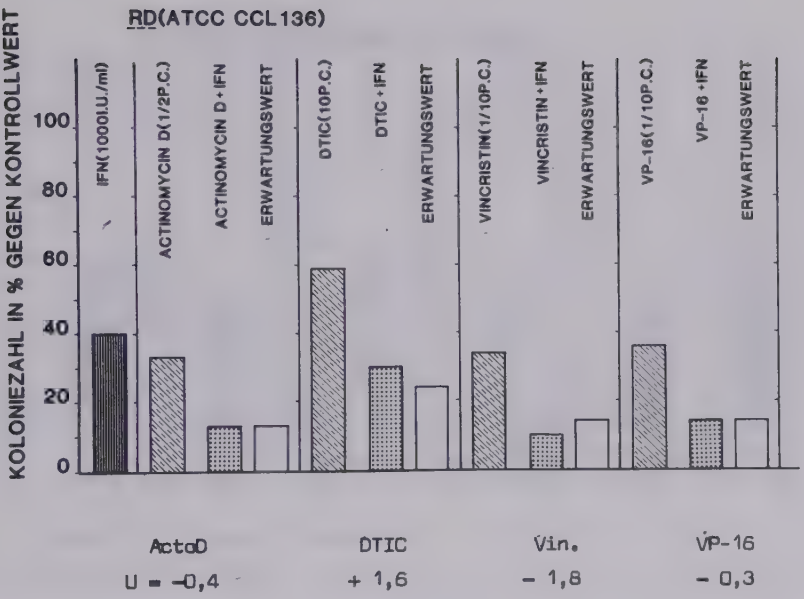
ActoD	Cis-p.	DTIC	Vin.	VP-16
U = -1,6	- 0,3	+ 0,5	+ 0,6	- 2,3

Abb.: 26 Ergebnisse der IFN-und Zytostatika - Kombinationsversuche mit der Monolayer - Methode bei der RD - Linie

Alle Ergebnisse mit der Monolayer - Methode bei der RD - Linie (Abb. 26) lagen im additiven Bereich.

DTIC und Vincristin in der Kombination mit IFN führten zu positiven U - Werten, VP-16 und IFN zu den höchsten negativen U - Werten und damit zum größten Abstand zur jeweiligen Einzelbehandlung der Substanzen.

RD : (Agar)



ActoD	DTIC	Vin.	VP-16
U = -0,4	+ 1,6	- 1,8	- 0,3

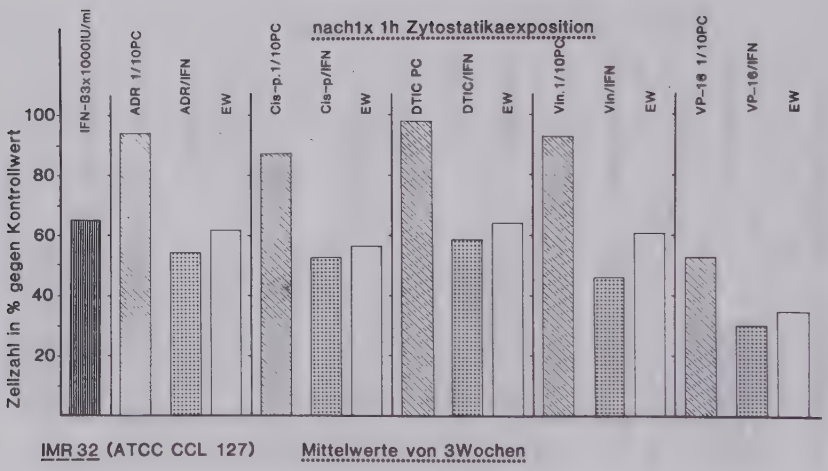
Abb.: 27 Ergebnisse der IFN-und Zytostatika - Kombinationsversuche mit der Agar - Methode bei der RD - Linie

Die Kombinationsergebnisse mit der Agar - Methode bei der RD - Linie (Abb. 27) lagen im additiven Bereich.
Der U - Wert von DTIC war positiv, der von Vincristin war der negativste aller Kombinationen.

Vergleich der Methoden bei der RD - Linie

Mit beiden Methoden lagen die U - Werte im additiven Bereich und waren für DTIC positiv.
Die Kombinationsbehandlung war immer wirksamer als die Einzelbehandlung.

IMR - 32 : (Monolayer)



IMR 32 (ATCC CCL 127) Mittelwerte von 3Wochen

ADR	Cis-p.	DTIC	Vin.	VP-16
U = -2,0	- 1,4	- 1,8	- 2,4	- 2,3

Abb.: 28 Ergebnisse der IFN-und Zytostatika - Kombinationsversuche mit der Monolayer - Methode bei der IMR 32 - Linie

Die U - Werte für die Kombination in Abb. 28 sind nicht signifikant oberhalb oder unterhalb des additiven Bereichs.

Alle U - Werte sind negativ und haben die Erwartungsrate erreicht.

IMR - 32 : (Agar)

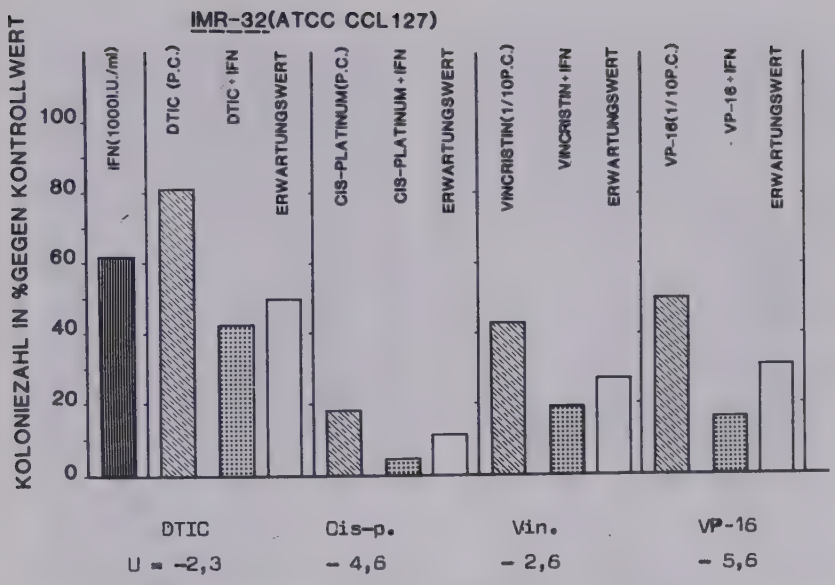


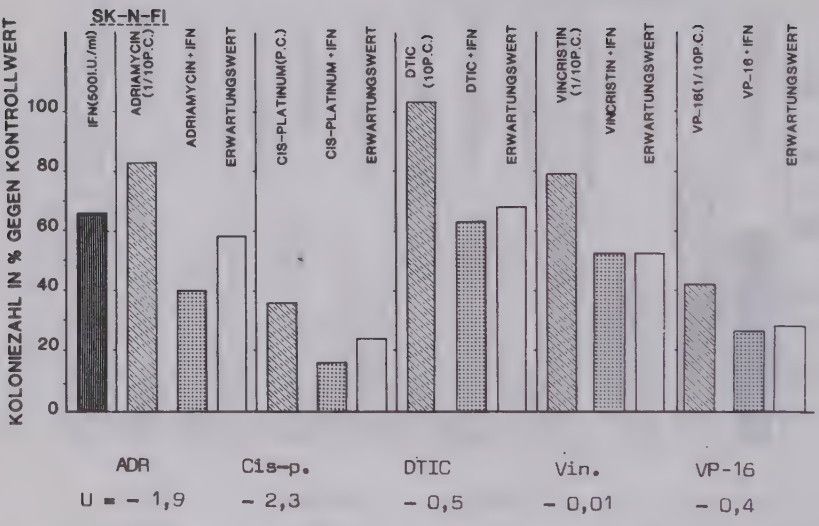
Abb.: 29 Ergebnisse der IFN-und Zytostatika - Kombinationsversuche mit der Agar - Methode bei der IMR-32 - Linie

Die Kombination von IFN mit Cis-p., Vin. oder VP-16 unterschreitet die U - Werte signifikant, der U - Wert von DTIC und IFN ist nicht mehr signifikant.

Vergleich der Methoden bei der IMR - 32 - Linie

Die U - Werte von Cis-p. und VP 16 sind bei der Agar - Methode wesentlich grösser. Alle U - Werte deuten aber bei beiden Methoden in die gleiche Richtung einer mindestens additiven Wirkung der Kombination, wobei zu bemerken ist, daß die Kombination Cis-p. und IFN in der Agar - Methode mit Peak-Konzentration und in der Monolayer - Methode mit 1/10 P.C. durchgeführt wurde.

SK - N - FI :(Agar)



ADR	Cis-p.	DTIC	Vin.	VP-16
U = - 1,9	- 2,3	- 0,5	- 0,01	- 0,4

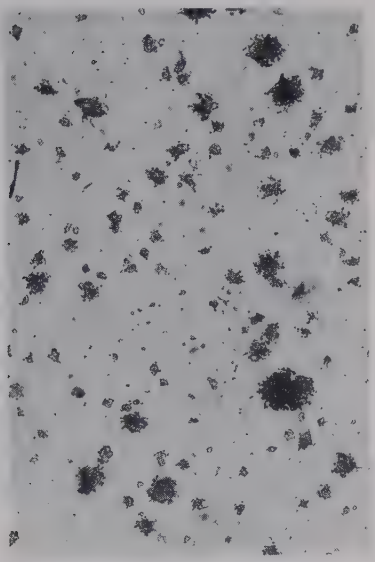
Abb.: 30 Ergebnisse der IFN-und Zytostatika - Kombinationsversuche mit der Agar - Methode bei der SK - N - FI - Linie

Der Kombinationsversuch mit der SK - N - FI - Linie wurde nur mit der Agar - Methode durchgeführt.

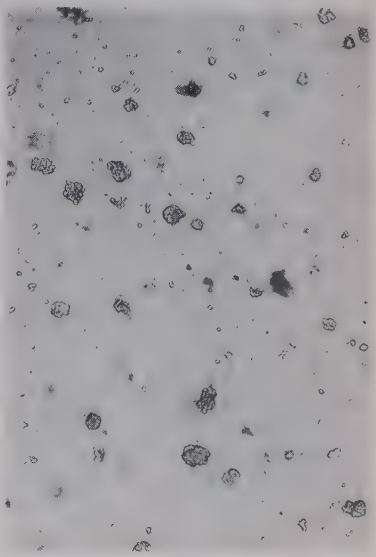
Die Kombination von Cis-p. und IFN erwies sich als synergistisch, der Erwartungswert wurde signifikant unterschritten. Alle anderen U - Werte sind negativ, d.h. die Erwartungswerte wurden mindestens erreicht.

Photo 4 : Ergebnis der Kombination Acto D und IFN bei der SAOS - 2 - Zellinie photomikroskopisch.
Vergrößerung 40 mal, 21. Tag nach Versuchsansatz
Agar - Methode

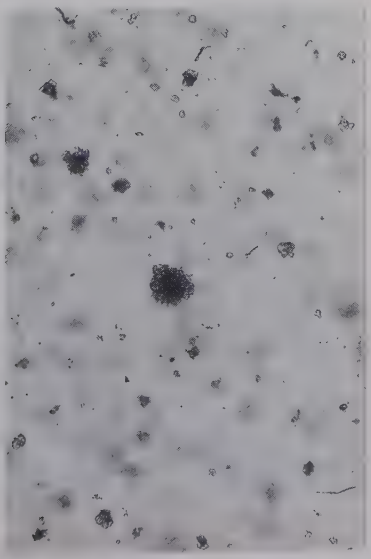
4a) Kontrolle (100 %)



4b) Acto D (P.C.) (82 %)



4c) IFN - B(100 I.U./ml)(54 %)

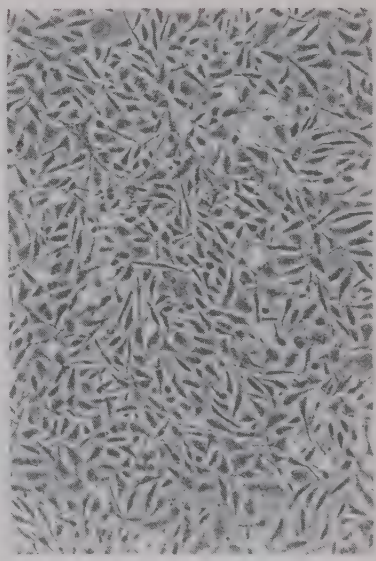


4d) Kombination (16 %, U=6,7)

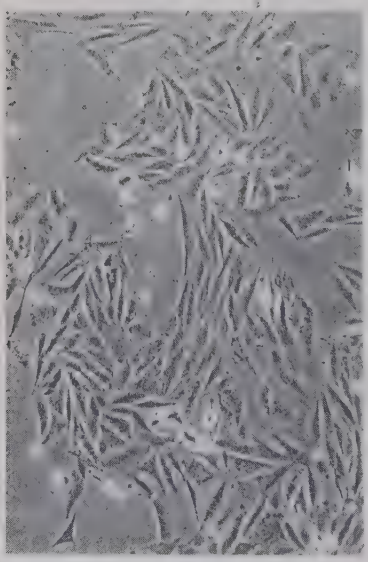
Photo 5 : Ergebnis der Kombination ACTO D und IFN bei der SAOS - 2 - Zellinie wie in Abbildung 4 jedoch mit der Monolayer - Methode
Vergrößerung 100 mal, 2. Woche nach Versuchsansatz

5a) Kontrolle 100 %

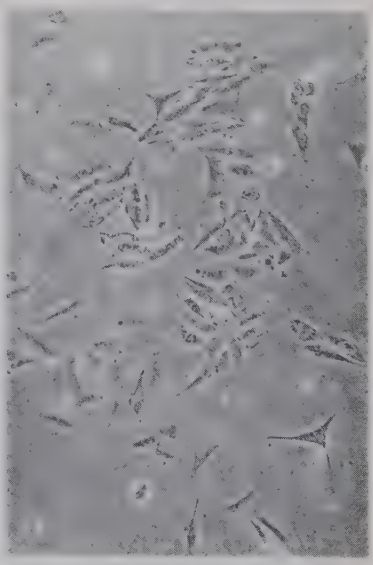
5b) Acto D 94 %



5c) IFN 44 %



5 d) Kombination 27 %



3.8.2. ZUSAMMENFASSUNG der KOMBINATIONSERGEBNISSE

Es kann festgehalten werden, daß mit beiden Methoden bei allen Zellinien, außer bei MTX und IFN mit der Monolayer-Methode in der ersten Woche der Erwartungswert nicht signifikant unterschritten wurde, d.h. ein Antagonismus nicht beobachtet werden konnte.

Tabellarische Übersicht über die Kombinationsergebnisse:

Linie	Methode	ActoD	ADR	Cis-p	DTIC	MTX	Vin	VP-16
SAOS-2	Mono	NS	S	S		NS		S
	Agar	S	S	S		NS		S
RD	Mono	NS		NS	NS		NS	NS
	Agar	NS			NS		NS	NS
IMR 32	Mono		NS	NS	NS		NS	NS
	Agar			S	NS		S	S
SK-N-FI	Agar		NS	S	NS		NS	NS

NS = additiv
S = synergistisch

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, wurden mit MTX/IFN und DTIC/IFN unabhängig von der Zellinie die geringsten Kombinationseffekte erzielt. Mit Cis-p/IFN, ADR/IFN und VP-16/IFN wurden die stärksten Zellreduktionen erreicht, schwächer wirksam war die Kombination ActoD/IFN und VCR/IFN.

4. DISKUSSION

Die bisherigen Therapieerfolge mit Interferon als Monotherapie ergaben nur in Einzelfällen bessere Erfolge als mit heute üblichen zytostatischen Substanzen. Deshalb wird zur Zeit versucht Interferon in die Zytostatikatherapie zu integrieren. Es gibt bis jetzt jedoch erst wenige in-vitro-Untersuchungen, aus denen Hinweise für die kombinierte Wirkung von Interferon und Zytostatika entnommen werden können.

Deshalb war die Hauptfragestellung dieser Arbeit die Prüfung des Wachstumsverhaltens menschlicher Tumorzellen, die mit Interferon und Zytostatika behandelt werden (4.8.).

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf in-vivo-Verhältnisse ist begrenzt; das Für und Wider wird in Kapitel 4.1. diskutiert.
Ein Vergleich der kolonienbildenden Agarmethode dieser Arbeit mit der Monolayermethode schließt sich an (4.2.).
Bei der Vorbereitung und Durchführung der Kombinationsversuche ergaben sich zusätzliche Fragestellungen: Mockeffekt (4.4.), Interferonvergleich (4.5.), Zeitversuche (4.6.) und reine Zytostatikaversuche (4.7.).

4.1. Vergleich : in vitro - in vivo

In diesem Teil soll versucht werden, Unterschiede von in-vitro-Versuchen und in-vivo-Bedingungen deutlich zu machen. Vereinfachend werden die Unterschiede tabellarisch aufgeführt.

1) Bei in-vitro-Untersuchungen fehlt das Immunsystem und damit die mögliche Interaktion der Medikamente, des Tumors und des Wirts. (Dies gilt weitgehend auch für Versuche mit "Nude Mice") (84).

2) Die Interaktion der Zellen ist bei einer Einzelzellsuspension verändert (85). Mögliche Reparaturmechanismen nach Medikamentengabe sind ohne den Wirt eventuell vermindert (40).

3) Die in vitro wachsenden Tumorzellen wachsen meist schneller und teilen sich öfter als in vivo. Es handelt sich meist um rasch proliferierende, anaplastische Tumoren (85).

4) Durch diese Zellkinetik und das häufige Passagieren ist die Züchtung von Subkulturen und immer anaplastischeren Inzuchtstämmen möglich. Die Zellen können sich schließlich in manchen Eigenschaften vom ursprünglichen Tumor unterscheiden und dadurch die Übertragbarkeit der Ergebnisse in Frage stellen.

5) Durch direkte Manipulation der Zellen wie Pipettieren, Trypsinieren etc. können sich Membran- und Zellschäden ergeben, die Zellen sind dann vorgeschädigt (15, 40).

6) Die Zellen können durch MEM, humorale und andere Faktoren verändert werden (40).

7) Die Empfindlichkeit der Zellen ist teilweise von der verwendeten Zellkulturmethode abhängig (57).

8) Die Korrelation der Medikamentenkonzentration von in vitro zu in vivo ist noch nicht vollständig geklärt (31); TREUNER et al. haben in vivo Interferonspiegel gemessen von maximal 324 I.U./ml IFN - B bei einer injizierten Dosis von $9{,}6 \times 10^6$ I.U./m^2 (108). SALMON (86) wies nach, daß ein Tumor, dessen Zellen in vitro auf 1/10 Peak-Konzentration eines Zytostatikums sensibel reagieren, in vivo auf die Peak-Konzentration des Zytostatikums anspricht. Bei den meisten Zytostatika wurden für die Kombinationsversuche die 1/10 Peak-Konzentration benutzt.

Die zweite Tabelle zeigt Folgerungen aus Untersuchungen, die sich mit der Übertragbarkeit von in vitro erzielten Ergebnisse auf in vivo beschäftigen:

1) Nach ROCKWELL sind in-vitro-Untersuchungen ein exzellentes Modell, wenn nur einzelne Faktoren untersucht werden (85). (Hier wurde nur ein Faktor, die direkte Zellvermehrungshemmung, gemessen).

2) BROWN behauptet, die in-vitro-Ergebnisse seien zwar nicht direkt übertragbar, aber die ihnen zugrunde liegenden Mechanismen (20).

3) Mit in-vitro-Tests wurde die unterschiedliche Chemosensitivität von Patienten mit morphologisch ähnlichen Tumoren nachgewiesen (31).

4) Gegen Zytostatika in vitro resistente Tumoren waren auch in vivo resistent (31).

5) Es besteht eine positive Korrelation der Überlebenszeit von Patienten mit den in-vitro-Testergebnissen, die mit Zellen aus den Patiententumoren durchgeführt wurden (31, 93, 111).

Im Vergleich mit der Monolayer - Methode wurden bei dieser Arbeit weitgehend gleiche, bei einzelnen Zellinien und Medikamenten sich unterscheidende Ergebnisse erzielt. Die Ergebnisse stimmen mit denen anderer Untersucher überein (36, 52, 101).

Unter Berücksichtigung von vergleichenden in vitro - in vivo-Untersuchungen kann mit Vorbehalten angenommen werden, daß die erzielten Ergebnisse (10, 31) in vivo gelten.

Auf die Problematik der Übertragbarkeit wird näher in den einzelnen Kapiteln eingegangen.

4.2. Methodenvergleich

4.2.1. Kolonienbildende Agarmethode

Mit dieser Methode können außer etablierten Zellinien auch Primärtumoren ausgetestet werden. Im Agar wachsen und teilen sich maligne Zellen, jedoch keine Fibroblasten.

Die Zellen werden als Einzelzellsuspension ausgesät, daraus bilden sich Cluster und Kolonien.
Die Ausbeute an Kolonien war unter sonst gleichen Wachstumsbedingungen direkt proportional der Zahl der ausgesäten Zellen. Weiter war die Koloniausbeute von der "cloning efficiency" der jeweiligen Zellinie und von der Qualität des FKS abhängig (siehe 3.2.).

Obwohl alle ausgesäten Zellen lebten (was mit der Trypanblaufärbung nachgeprüft wurde), bildeten nicht alle Zellen Kolonien. Auch mit dem besten FKS betrug die Koloniausbeute nur 6 % der ausgesäten Zellen.
Ich definierte, daß eine Kolonie aus mehr als 100 Zellen besteht. Daher wurde nur eine solche Einzelzelle zur Kolonie, die sich nach der Aussaat einschließlich ihrer Tochterzellen noch öfters als 6 x teilte.
Nach SALMON werden mit diesem Assay die sogenannten "Stammzellen" gemessen (86). Die Stammzelltheorie (32) postuliert, daß das Wachstum von Tumoren dem physiologischen Wachstum bestimmter Gewebe entspricht (Knochenmark, Gastrointestinaltrakt, Epidermis). Nur ein kleiner Teil von relativ undifferenzierten Zellen, die Stammzellen, soll die Fähigkeit unbegrenzter Teilungsfähigkeit besitzen. Die Mehrzahl der Gewebszellen, und zwar diejenigen, die morphologisch und funktionell die Spezifität des jeweiligen Gewebes ausmachen, soll differenzierter sein und damit die Fähigkeit zum unbegrenzten Wachstum verloren haben. Tumoren sollen von einzelnen Stammzellen abstammen, die der normalen Restriktion und Kontrolle des Wachstums entronnen sind. Die Stammzellen erzeugen dann die Masse der weiter differenzierteren Tumorzellen. Bei Ausschwemmung sind die Stammzellen wahrscheinlich die Zellen, die Metastasen bilden.

Die Tumortherapie muß also vor allem auf die Ausrottung dieser Stammzellen zielen.
Die grossen Kolonien enthalten im Gegensatz zu den Clustern Zellen, die sich weiter unbegrenzt teilen können und somit die postulierten Stammzelleigenschaften besitzen.
Der Assay mißt also quantitativ die Interaktion zwischen Medikament und Stammzellen.
Im Gegensatz zur Monolyer - Methode ist im Agar nach dem Aussäen eine erneute medikamentöse Manipulation der Zellen nur begrenzt möglich.

4.2.2. Monolayer - Methode

Zu Versuchsbeginn wurde eine bestimmte Zahl von Zellen (100 000 Zellen/Loch) ausgesät, die dann als Monolayer auf dem Plastikboden wuchsen.
Die unbehandelten Tumorzellen befinden sich, wie DILGER nachwies, während der Dauer des gesamten Versuchs in der log - Phase, d.h. die Zellzahl wächst exponentiell an.
Exponentielles Wachstum bedeutet jedoch nicht, daß jede einzelne Zelle sich teilt. Die Wachstumskurve verläuft auch dann exponentiell, wenn der Anteil der sich teilenden Zellen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl gleichbleibt.
Die Zellen unterscheiden sich in der Steigung der Wachstumsgeraden, das heißt der Zellverdoppelungszeit.

Bei der Monolayer-Methode werden im Gegensatz zur kolonienbildenden Agar - Technik alle Zellen gezählt, die zum Auswertungstermin fest auf dem Plastik haften, also alle nur mit Trypsinierung abwaschbaren Zellen.

Durch die wöchentliche Auswertung lassen sich zeitliche Einflüsse von Medikamenten studieren.

Während des drei oder mehr Wochen laufenden Versuchs ist die Kombination und Konzentration abänderbar.

Dieser Assay eignet sich für etablierte Zellinien. Bei Versuchen mit Primärtumoren überwuchern die darin enthaltenen Fibroblasten die Tumorzellen.

4.2.3. Vergleich der beiden Methoden

Obwohl mit beiden Methoden verschiedene Parameter des Tumorwachstums (Gesamtzahl aller Zellen bzw. Anzahl an Kolonien) gemessen werden, zeigen die Ergebnisse in dieselbe Richtung und liegen quantitativ in derselben Grössenordnung. Die Resultate werden im einzelnen in den folgenden Kapiteln verglichen und diskutiert.

Die Tabelle auf der nächsten Seite zeigt verschiedene Aspekte der beiden Methoden im Vergleich.

Für Kombinationsversuche bei denen die Reihenfolge bzw. die Expositionsdauer der Medikamente variiert werden soll, wäre es sinnvoll, die beiden Methoden zu kombinieren, die Zellen also zuerst im Monolayer mit verschiedenen Medikamenten zu behandeln und danach im Agar auszusäen.

Monolayer-Methode	Kolonienbildende Agarmethode
ANSATZ mit	
etablierten Zellinien	etablierten Zellinien und Primärtumoren (Prüfung der in-vivo-Sensibilität gegen Zytostatika in vitro möglich)
EXPOSITION mit MEDIKAMENTEN	
während Versuch Konzentration änderbar, anderes Medikament zufügbar	nach Aussaat im Agar kaum weitere medikamentöse Manipulation der Zellen möglich
Medikament kommt ("physiologisch") erst auf Zellen, die bereits einen Tag angewachsen sind	Zeitexposition: frisch trypsinierte Monolayerzellen kommen in Suspension für best. Zeit mit Medikament in Kontakt, werden danach ausgesät
AUSWERTUNG	
alle Zellen werden gezählt Zellzahlbestimmung durch Coulter-Counter oder Fuchs - Rosenthal - Zählkammer	Kolonien werden gezählt, die aus "Stammzellen" entstanden Koloniezahlbestimmung durch Auszählung durchs Phasenkontrastmikroskop
zeitliche Verlaufstudien durch wöchentliche Auswertung	ohne Zählcomputer zeitliche Auswertung nicht möglich

4.3. Antiproliferativer Effekt des Interferon

Seit den Versuchen von PAUCKER, CANTELL und HENLE (80) ist es bekannt, daß Interferon das Wachstum von Zellkulturen hemmen kann und zwar sowohl das Wachstum von Fibroblasten wie von malignen Zellen (9).

Dabei wirkt Interferon nicht direkt toxisch auf die Zellen (81, 46). Auch bei den Versuchen dieser Arbeit war während oder nach der Exposition mit Interferon keine Lyse oder Degeneration der Zellen festzustellen. Die ausgewerteten Zellen zeigten lichtmikroskopisch weder abnorme Formen oder Kontraktionen, noch waren sie mit Trypanblau anfärbbar.

Die Zellen können sich von der antiproliferativen Wirkung des Interferon einige Zeit nach Wegfall der Interferonexposition erholen (siehe Abb. 21) (36, 99). Nach den Versuchen von GRESSER (46) gilt diese Reversibilität jedoch nicht für alle Zellen der Population; bei längerer Behandlung mit Interferon soll ein Teil der Zellen verloren gehen. Dieser Effekt ist konzentrationsabhängig. Verschiedene Zellinien sind verschieden sensibel gegen Interferon (28, 60, 82) es gibt sowohl sehr sensible als auch gegen Interferon resistente Zellinien. BRADLEY (18) fand sogar Zellinien, deren Kolonieausbeute im semisoliden Agar durch Interferon erhöht wurde; in den Löchern mit Interferon bildeten sich mehr Kolonien als in den Kontrollöchern.

Von den hier verwendeten Zellinien zeigte die SAOS - 2 (osteogenes Sarkom) schon bei 10 I.U./ml IFN . B, die IMR - 32 Zellinie (Neuroblastom) erst bei 1 000 I.U./ml IFN - B einen Abfall der Zell- bzw. Koloniezahl.

Verschiedene Zellinien der gleichen Tumorart können verschieden auf Interferon reagieren (18, 101). Von beiden Neuroblastomlinien zeigte die SK - N - FI einen Abfall bei 100 I.U./ml, die IMR - 32 erst bei der zehnfachen Menge, nämlich 1 000 I.U./ml.

Die verwendeten Zellinien wurden bereits von TREUNER et al. im Monolayer gegen IFN - α und IFN - B ausgetestet (106). Die Ergebnisse liegen quantitativ in der gleichen Grössenordnung, die Reihenfolge der Empfindlichkeit der verschiedenen Zellinien entspricht unseren Ergebnissen.

STRANDER (101) testete die SAOS - 2 Linie mit der Monolayermethode gegen IFN - α . Seine Ergebnisse entsprechen denen, die im Monolayer mit IFN - B gemessen wurden.

Über den Mechanismus der IFN - induzierten Wachstumshemmung ist noch sehr wenig bekannt:
Nach BALWILK (9) soll jede Phase des Zellzyklus proportional verlängert werden.
WANATABE (115) zieht aus Versuchen mit Fibroblasten den Schluß, daß Interferon die Zellen während der G_1 - Phase in ein Ruhestadium (G_0) überführt.

Bei DAHL (28) wurden schnellwachsende Zellinien stärker durch dieselbe Menge Interferon gehemmt als langsamwachsende. Dies war in diesen Versuchen nicht der Fall; die gegen Interferon relativ unempfindliche IMR - 32 Zellinie zeigt dieselbe Steigung in ihrer Wachstumskurve wie die sehr empfindliche SAOS - 2 Linie (siehe Abb. 5 und 6).

4.4. Wachstumshemmende Wirkung der wärmeinaktivierten Mock - Präparation des Interferon - β

GRESSER (49) und KNIGHT (64) wiesen 1973 mit hochgereinigtem Mäuse - Interferon nach, daß das Interferonmolekül selbst sowohl antiviral als auch antiproliferativ wirkt. Diese Eigenschaften wurden für das menschliche Interferonmolekül bestätigt (101).
In der Literatur gibt es verschiedene und sich widersprechende Angaben darüber, daß "Nicht - Interferon - Anteile" in Interferonpräparationen bei in-vitro-Versuchen eine antiproliferative Wirkung zeigten (siehe Einleitung).

ADAMS, STRANDER und CANTELL stellten 1975 (2) bei der gegenüber IFN -α hochsensiblen Daudi - Linie (Burkitt's Lymphom) mit einer Mock - Präparation bis zu 10^5 U./ml keinen wachstumshemmenden Effekt fest.

1977 fanden STRANDER und EINHORN (101) mit 1 000 U./ml Mock - IFN -α bei 9 Osteosarkomzellinien einen leichten, variablen jedoch nicht signifikanten wachstumshemmenden Effekt. Dieser Effekt war viel schwächer ausgeprägt als mit der entsprechenden Dosis des Interferon - Präparats.

HILFENHAUS (59, 60) bestätigte die Ergebnisse von ADAMS et al. (2) bei der Daudi - Linie, die gegen Mock - α nicht sensibel ist. Er fand jedoch auch, daß die gegen IFN - α empfindliche P3HR 1- (Burkittś Lymphom) und Diehl I - Linien (Ebstein - Barr - Virus transformierte Lymphozyten) durch eine Mock - Präparation, die 2 000 U./ml IFN - α entsprach um 50 % in ihrem Wachstum gehemmt wurden.

In den obigen Arbeiten wurde mit Mock - α - IFN gearbeitet. Die verwendeten Mock - Präparationen wurden bei der Herstellung im Gegensatz zu richtigen Interferon - Präparationen nicht mit Virus induziert.

Über Mock - Präparate des IFN - B gibt es Arbeiten von PFEFFER (82) und MAYER - EICHBERGER (36).
Bei PFEFFER zeigte das Mock bis 2560 U./ml keinen antiproliferativen Effekt. Er macht jedoch keine Angaben über die Herstellungsweise seiner Mock - Präparation.

MAYER - EICHBERGER arbeiteten mit der Mock - Präparation der Firma Rentschler wie wir, jedoch mit einer anderen Charge und Monolayer.

Bei der SAOS - 2 - Zellinie bemerkten MAYER - EICHBERGER bei der 10^3 I.U./ml entsprechenden Menge Mock - IFN eine schwache, bei 10^4 I.U./ml eine starke Reduktion der Zellzahl. Die antiproliferative Wirkung des Mock - IFN war schwächer als bei der entsprechenden Menge IFN - B; 10^4 I.U./ml Mock - IFN entsprachen in der Wirkung 10^3 I.U./ml IFN - B.
Durch die Versuche dieser Arbeit konnten die MAYER - EICHBERGER'schen Ergebnisse bestätigt werden.
Dieselbe Menge Mock - IFN zeigte sowohl bei der gegenüber Interferon sehr empfindlichen SAOS - 2 - Linie, als auch bei der unempfindlicheren IMR - 32 - Zellinie den gleichstarken antiproliferativen Effekt in der Monolayer- und in der kolonienbildenden Methode (s.Abb. 7 u. 8).

Es stellt sich die Frage, ob dieser Mock - Effekt bewirkt wird durch eine bei der Wärmeinaktivierung entstehende neue Substanz (Abbauprodukt) oder diese "nicht Interferon" bedingte antiproliferative Wirkung primär jeder Interferon - Präparation zugehöriger Faktor (z.B. Protein - Stabilisator) ist.
Mit Hilfe von humanem Serum, das Antikörper gegen IFN - B enthält, versuchte ich, dem Mockeffekt nachzugehen. Die benutzte Antikörperkonzentration reichte aus, die 10 - fache Menge des vorhandenen Interferons zu inaktivieren.

Bei 1 000 I.U./ml IFN - B ergab sich keine vollständige Aufhebung des antiproliferativen Effekts durch IFN - B - Antikörper. Die SAOS - 2, als auch die IMR - 32 - Zellinie reagierten mit derselben Hemmung, wie dies mit 1 000 I.U./ml Mock - IFN beobachtet wurde (siehe Abb. 7 und 8).

Die antiproliferative Wirkung des hochgereinigten Knight'schen IFN - B wurde durch IFN - B - Antikörper völlig aufgehoben (siehe Abb. 9).

Nach diesen Versuchen enthält die von Rentschler hergestellte IFN - B -Präparation also eine antiproliferativ wirkende Nicht - IFN - B - Komponente, die sich ab einer Konzentration von 1 000 I.U./ml antiproliferativ auswirkt.

Klinisch ist dieser Effekt bei den zur Zeit verwendeten Interferon - Dosen nicht relevant. TREUNER et al. beobachteten nach der i.v. - Applikation von IFN - B bei Kindern 384 I.U./ml als höchsten Serumspiegel bei einmaliger Dosis von $9{,}6 \times 10^6$ I.U./m^2 KO*IFN - B. Bei dieser Konzentration des Interferons im Serum spielt der antiproliferative "Mock" - Effekt nach diesen Ergebnissen keine Rolle.

* KO = Körperoberfläche

4.5. Vergleiche der antiproliferativen Wirkung von alpha, beta und gamma Interferonen

4.5.1. Vergleich von alpha und beta Interferon

Die antivirale und antiproliferative Wirkung von IFN - α (Leukozyteninterferon (101), Lymphoblasteninterferon (Namalva) (9, 91), IFN - B (Rentschler (36), Knight (64) Interferon) und IFN - γ (26) wurde in vielen in-vitro-Untersuchungen nachgeprüft und die antiproliferative Wirkung der verschiedenen Interferone, (bei gleicher antiviraler) Aktivität (24, 37) verglichen.

STRANDER (38) vermutete, daß die verschiedenen Interferone einen gewebsspezifischen Faktor besitzen.
In seinen Untersuchungen war IFN - B bei zwei Osteosarkomlinien und IFN - α bei zwei Lymphoblastenlinien wirksamer.

HILFENHAUS (59) fand allerdings nur eine geringe Wirkungsdifferenz zwischen IFN - α und IFN - B bei der von STRANDER getesteten Lymphoblastenlinie Daudi.

BRADLEY (18) testete eine Vielzahl von Tumoren, bei denen Lymphoblasten- und Leukozyteninterferon etwa die gleiche, aber eine geringere antiproliferative Aktivität als IFN - B zeigten.

In den Untersuchungen von TREUNER et al. (106) war IFN - B bei der SAOS - 2, RD und IMR 32 ebenfalls wirksamer, in einzelnen Wochen sogar mehr als 10 - fach.

Mit den Versuchen dieser Arbeit werden diese Ergebnisse bestätigt.
IFN - α besitzt eine geringere Wachstumshemmung als IFN - B.
Von den beiden Fibroblasteninterferonen ist das höher gereinigte IFN - B (Knight) antiproliferativ wirksamer.

4.5.2. Vergleich von IFN - B (Rentschler) mit IFN - γ (Nielsen)

Die antiproliferative Wirkung des seit kurzer Zeit zur Verfügung stehenden IFN - γ (Immuninterferon) wurde erst in wenigen in-vitro-Untersuchungen ausgetestet.
CRANE (26) fand in Versuchen mit weiblichen Mäusen mit osteogenem Sarkom, daß IFN - γ 100 - fach wirksamer sei als IFN - α .

BERISH (13) berichtete nach Versuchen mit einer Hela, SAOS und FS - 4 - Zellinie von einer 100 - fach stärkeren Wirkung des IFN - γ gegenüber IFN - B.

BLALOCK (14) testete seine Linien Wish und HEp 2 mit IFN - α , IFN - B und IFN - γ . IFN - γ war ca. 60 - mal, IFN - B 15 mal effektiver bezogen auf IFN - α .

Bei gleicher antiviraler Aktivität war die antiproliferative Wirkung, in Versuchen von EIFE (37) mit Hela - Zellen von IFN - γ 4 mal, von IFN - B 2 mal stärker als von IFN - α .

Mit der Agar - Technik wurde bei der SAOS - 2 ein 4 mal, bei der IMR 32 ein 40 fach stärkerer Effekt erzielt.
Der stärker wachstumshemmende Effekt des IFN - γ ist bei den gegen IFN - α und IFN - B relativ resistenten IMR 32 - Zellen weit ausgeprägter als bei den sensiblen SAOS - 2 Zellen.

Auf Grund der Untersuchungen von BERISH (13) bieten sich zwei Erklärungsmöglichkeiten an:

1) Die antivirale Aktivität gleichmolarer IFN - B - und IFN - γ - Lösungen war bei 4 untersuchten Virusarten verschieden. Die Replikation zweier Virusarten wurde mehr durch die IFN - B - Lösung, die der anderen mehr durch die IFN - γ - Lösung gehemmt.

Eventuell ist die Virusart, mit der die I.U. des IFN's standardisiert werden, empfindlicher gegen IFN - α und IFN - β als gegen IFN - γ. Damit wäre eine IFN - γ - Lösung gleicher antiviraler Aktivität höhermolar.

2) Zweitens zeigte er, daß IFN - γ bei menschlichen Fibroblasten Proteine mit einer wesentlich anderen Aminosäuresequenz induziert als IFN - α und IFN - β.
Das würde für einen möglichen anderen Wirkungsmechanismus des IFN - γ sprechen.
Die ausgeprägtere Wirkung des IFN - γ bei der gegen IFN - α und IFN - β relativ resistenten IMR 32 könnte durch folgende Beobachtungen ANKEL's (8) erklärt werden:

IFN - α und IFN - β sollen im Gegensatz zu IFN - γ durch erhöhte Gangliosidspiegel gehemmt werden.
Bei vielen Tumoren werden erhöhte Gangliosidspiegel gemessen (8).

4.6. Ausbildung der antiproliferativen Wirkung des Interferons in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit

Für den klinischen Einsatz von Interferon ist es bis heute noch ungeklärt, wie lange entsprechende Interferonspiegel im Plasma aufrecht erhalten werden müssen.
Versuche, die bisher mit Zellkulturen darüber gemacht wurden, zeigen widersprüchliche Ergebnisse.
Nach 6 h- und 12 h- Exposition mit Interferon fand GRESSER (45) mit einer kolonienbildenden Methode in Agarose bei der Mäuseleukämiezellinie L_{1210} nur einen schwach antiproliferativen Effekt, der bei der 24 h- und vor allem der 48 h- Exposition stärker wurde.
Humane Fibroblasten wurden bei PFEFFER (82) nach einer 1 h- Exposition mit IFN - B bereits gleich stark in ihrem Wachstum gehemmt wie mit 4 tägiger Dauerexposition.

BRADLEY (18) testete im semisoliden Agarsystem eine humane Myelomlinie und einen humanen Primärtumor (Ovarialkarzinom aus frischem Ascites) gegen 1 000 I.U./ml IFN - B aus. Nach der 1 h- Exposition bekam er beides mal eine gleiche Reduktion der Koloniezahl wie mit Dauerexposition.

In den Versuchen dieser Arbeit ergab sich bei der SAOS - 2 Linie und der SK - N - FI Linie (bei den Resultaten nicht dargestellt) nach einmaligem vorsichtigen Zentrifugieren der Zellen (800 min^{-1}) und Abziehen der überstehenden Lösung ein PFEFFER und BRADLEY vergleichbarer Effekt. Nach nur 10'-Exposition mit IFN - B wurde die Kolonieausbeute gleichstark gesenkt wie bei der Dauerexposition.

Nachdem die Zellen jedoch 2 x zentrifugiert (1 200 min^{-1}) und jeweils danach in frischem HBSS resuspendiert wurden, hob sich der antiproliferative Effekt sogar noch nach 120'-Exposition völlig auf.

Eventuell sind für die Ausbildung des antiviralen Status so lange Interaktionszeiten nicht nötig. Mit hohen Interferondosen (1 000 I.U./ml IFN - β bei der RD - Linie, 5 000 I.U./ml IFN - β bei der IMR - 32) wurde die Aktivität der 2' - 5' Synthetase (nach 1 maligem Waschen) bereits nach 10'-Exposition stark erhöht.

Aus den Ergebnissen ergibt sich folgende Hypothese:
Die Interferonmoleküle binden sich in kurzer Zeit an ihre spezifischen Rezeptoren an der Zelloberfläche (10' reichen aus).

Bei einmaligem vorsichtigen Abzentrifugieren der Zellen und Abziehen des Überstandes bleiben die Interferonmoleküle an den Rezeptoren hängen und üben dann danach immer noch ihre antiproliferative Wirkung aus.
Durch öfteres Waschen werden die Interferonmoleküle jedoch zum größten Teil von den Rezeptoren getrennt; die Interaktion zwischen Interferonmolekül und dem Rezeptor hört also mit dem Waschen effektiv auf.

4.7. Expositionsversuche mit Zytostatika

Das Wissen über die Pharmatokinetik und die konkrete intrazelluläre biochemische Wirkung der einzelnen Zytostatika ist noch sehr lückenhaft. Die "Target - Theorie" ist die zur Zeit übliche Theorie zur Analyse der Zytostatikawirkung, da zu ihrer Anwendung kein biochemisches Vorwissen notwendig ist und sie trotzdem eine quantitative Auswertung der Ergebnisse ermöglicht. Sie soll hier die Interaktion von Zelle und Medikament bzw. zwischen zwei Medikamenten bei diesen Kombinationsversuchen erklären (siehe 4.8.).

Die Target Theorie wurde 1955 von LEA (69) zur Erklärung der Wirkung von Bestrahlung auf Zellen entwickelt und von DREWINKO (34) so modifiziert, daß sie auf Zytostatika anwendbar ist.

Die Zelle wird als "black box" verstanden, von deren Innenleben nichts bekannt ist. Es wird in der Zelle eine diskrete Zahl sich unterscheidender Strukturen und Prozesse postuliert (= Targets). Diese Targets sind an den zellulären Aktivitäten beteiligt, die für die Reproduktion der Zelle notwendig sind. Sie entsprechen essentiellen Makromolekülen bzw. kritischen biosynthetischen Reaktionsketten.

Nach der Theorie muß eine fixe, kritische Zahl solcher Targets inaktiviert werden, damit sich die Zelle nicht mehr teilen kann bzw. letal geschädigt wird.
Werden mehr Targets getroffen, entspricht das einem "Overkill" der Zelle.
Wenn weniger Targets als die kritische Zahl getroffen werden, führt das nicht zum reproduktiven Tod der Zelle, sondern zu ihrer subletalen Schädigung. Diese Schädigung kann von aussen gar nicht bemerkbar sein; sie kann aber auch zur Verlangsamung des Zellzyklus führen.

Der in Versuchen nach Zytostatikaexposition gemessene Abfall der Zell- bzw. Koloniezahl sagt wenig über das Verhältnis letal zu subletal geschädigter Zellen aus.

Beim Monolayerverfahren sinkt die Zellzahl gegenüber der unbehandelten Kontrolle, wenn Zellen

a) absterben
b) sich nicht mehr teilen
c) sich langsamer teilen.

Bei der kolonienbildenden Agarmethode werden diejenigen Zellen einschließlich ihrer Tochterzellen als Kolonien gemessen, die sich nach der Aussaat öfter als fünf mal teilen (siehe 2.2.2.). Wird durch das Zytostatikum die Zahl dieser Zellen auf irgend eine Weise eingeschränkt, so fällt die Koloniezahl ab.

Zellen aus Zellkulturen reagieren in den verschiedenen Wachstumsphasen verschieden sensibel gegenüber Zytostatika (77). Wir passagierten daher unsere Zellkulturen drei bis vier Tage vor Versuchsbeginn, sodaß sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befanden.

Für die Planung und Auswertung der Expositionsversuche mit Zytostatika sind zwei pharmakokinetische in-vivo-Parameter wichtig:

1) das Produkt aus Plasmakonzentration und Zeit (CXT)
2) die höchste im Plasma erreichte Zytostatikakonzentration (Peak-Konzentration)

Von Tumoren in Mäusen und von Zellkulturen ist bekannt, daß die Stärke der zellulären Schädigung meist direkt vom Produkt aus Konzentration und Einwirkungszeit des Zytostatikums abhängt (5.6.). Höchstwahrscheinlich besteht dieser Zusammenhang auch bei der in vivo Behandlung mit Zytostatika. Der Vergleich des von uns in vitro angewandten Produkts aus Konzentration und Zeit mit dem von den einzelnen Zytostatika jeweils in vivo erreichten CXT ist also angebracht. Das CXT entspricht der Fläche unterhalb der empirisch gewonnenen Verlaufskurve des Zytostatika - Spiegels im Plasma. Ob die Plasmakonzentration der einzelnen Zytostatika der jeweiligen Konzentration entspricht, die die einzelnen Zellen im Tumor auch erreicht, ist eher nicht anzunehmen.

Von den von uns verwandten Konzentrationsstufen erscheint die 1/10 Peak - Konzentration klinisch am relevantesten. Zum einen erreicht eventuell nur ein kleiner Teil der Plasmakonzentration die Tumorzellen. Zum anderen wies SALMON (86) folgendes nach: Die im semisoliden Agar gemessene Sensibilität eines Primärtumors gegen ein Zytostatikum entspricht nur dann auch dessen in vivo Sensibilität, wenn der Primärtumor in vitro schon gegen niedere Zytostatikakonzentrationen (z.B. 1/10 Peak-Konzentration) sensibel ist.

Die Expositionsdauer der Zellen gegenüber dem Zytostatikum betrug 24 Stunden bei der Monolayer Methode und 1 Stunde bei der koloniebildenden Methode. Damit war das Produkt aus Konzentration und Zeit beim Monolayer 24 mal höher. Das wirkte sich vor allem bei den Versuchen mit 1/10 Peak Konzentration aus. Die 1/10 Peak-Konzentration führte im Monolayer immer zu einem stärkeren Abfall der Zell- bzw. Koloniezahl gegenüber der Kontrolle als im Agar.

Mit zunehmender Zytostatikakonzentration zeigte sich wie erwartet bei allen Zytostatika mit Ausnahme von DTIC im Agar eine Wirkungssteigerung und zwar bei beiden Methoden. Wenn die Expositionszeit fest ist, ist also der subletale und letale Schädigungsgrad von der zugefügten Zytostatikakonzentration abhängig.

Die Zytostatika werden jetzt im einzelnen besprochen:
Das Antibiotikum Actinomycin D wurde bei der SAOS - 2 und der RD - Linie getestet (Abb. 15 - 19) und ist mit seiner Peak-Konzentration bei beiden Methoden gut wirksam.
Wohl wegen der unterschiedlichen Expositionszeit wirkt Actinomycin D bei 1/10 Peak-Konzentration im Monolayer gut, jedoch im Agar nicht.

Das Produkt aus Konzentration und Expositionsdauer bei 1/10 Peak - Konzentration im Monolayer ist 0,18 ug x h/ml und entspricht ziemlich genau der in-vivo-CXT von 0,182 ug x h/ml nach nur einmaliger Gabe von Actinomycin D (nach den derzeitigen Behandlungsprotokollen wird Actinomycin D in der Klinik an mehreren Tagen hintereinander gegeben).

Bei der RD - Zellinie erholen sich die Zellen im Verhältnis zur Kontrolle ab der 2. Woche nach vorherig 24 stündiger Exposition mit 1/10 Peak-Konzentration (siehe Abb. 19). Beim entsprechenden Versuch mit Peak-Konzentration ist das nicht der Fall.

Das Antibiotikum Adriamycin wurde bei der SAOS - 2 und den beiden Neuroblastomlinien SK - N - FI und IMR 32 getestet. Am ehesten entspricht wieder 1/10 Peak-Konzentration mit dem Monolayer - Versuch den in-vivo-Bedingungen (CXT : in vitro 1,2 ug x h/ml, in vivo 1,38 ug x h/ml).
Die 1/10 Peak-Konzentration zeigt im Agar keine (SAOS - 2) bis gute Wirksamkeit (IMR 32). Die Zellinien sind also verschieden sensibel gegenüber Adriamycin.

Die 1/10 Peak-Konzentration wirkt im Monolayer (24 h-Exposition) immer stärker als im Agar (1 h-Exposition). Wenn dieser Abfall nicht Methoden bedingt ist, ist die Wirkung von Adriamycin abhängig von der Expositionsdauer. Das würde der Folgerung von ALBERTS (4) widersprechen, daß die Wirkung der alkylierenden und anthrazyklinen Zytostatika rein konzentrationsabhängig sei.

Der Nitroharnstoff BCNU wurde bei den beiden Neuroblastomzelllinien getestet.
Bei der kolonienbildenden Methode führt BCNU erst bei der nicht in vivo erreichbaren 10 fachen Peak-Konzentration zu einem Abfall der Koloniezahl.
Bei der Monolayer - Methode (24 h-Exposition) wirkt BCNU bei Peak - Konzentration deutlich. Bei 1/10 Peak - Konzentration wirkt der Nitroharnstoff in der 1. Woche schwach und die Neuroblastomzellen erholen sich in der 2. Woche völlig im Verhältnis zur Kontrolle.

Die in-vivo-CXT von BCNU beträgt wegen der kurzen Plasmahalbwertszeit (15 - 30 min) nur 1,02 ug x h/ml bei einer Peak-Konzentration von 1,97 ug/ml. Bei der kaum wirksamen 1/10 Peak-Konzentration im Monolayer beträgt das Produkt aus Konzentration und Expositionszeit 4,7 ug x h/ml. Diese beiden Neuroblastomlinien sind also relativ resistent gegen BCNU als Einzelsubstanz.

Für das Nichtansprechen der Neuroblastomzellen gegen BCNU bis zur Peak - Konzentration im Agar und für das überschießende Wachstum der SK → N - FI Linie in der 2. Woche bei 1/10 Peak-Konzentration (Abb. 22) könnte es folgende Erklärung geben: BCNU hat unter diesen Bedingungen keine Wirkung auf die Zellen, die in der Lage sind, sich zu teilen. Die Koloniezahl sinkt also nicht. Jedoch wird ein Teil der nichtteilungsfähigen Zellen abgetötet, die Zellzahl sinkt also in der 1. Woche. In der 2. Woche ist im Monolayer bei der Aussaat der Anteil der teilungsfähigen "Stammzellen" größer; es kommt gegenüber der Kontrolle zum überschießenden Wachstum.

DTIC wirkt im Agar bis zur 10 fachen Peak-Konzentration nicht.
Im Monolayer wirkt es bei 1/10 Peak-Konzentration kaum, bei Peak-Konzentration schwach bis mittelstark.
Die 1/10 Peak-Konzentration mit 24 h-Exposition entspricht der klinischen Behandlung, wenn DTIC nur 1 mal in der üblichen Dosis von 250 mg/m^2 gegeben wird (in-vitro-CXT = 36 ug x h/ml, in-vivo-CXT = 31 ug x h/ml). Unter diesen Bedingungen wäre DTIC als Einzelsubstanz bei diesen Zellinien fast wirkungslos. Bei den zur Zeit gängigen klinischen Behandlungsschemen wird DTIC jedoch an mehreren Tagen hintereinander gegeben. DTIC könnte stärker wirken. Die 1 x DTIC ausgesetzten Zellen erholen sich ab der 3. Woche nicht nur nach Exposition mit 1/10 Peak-Konzentration, sondern auch mit Peak-Konzentration (siehe Abb. 32).

Die Schwermetallverbindung Cis - platinum wurde bei allen Zellinien getestet.
Bei der Monolayer-Methode gehört Cis - platinum zu dem sehr gut wirksamen Zytostatika wie Adriamycin, Vincristin und VP - 16.
Im Agar wirkt Cis - platinum schwächer als die drei genannten.

Vom Produkt aus Konzentration und Expositionzeit entspricht jedoch die einstündige Expositionszeit mit Peak-Konzentration der kolonienbildenden Methode am ehesten den in-vivo-Bedingungen. (in-vitro CXT = 2,5 ug x h/ml, in-vivo-CXT = 1,94 ug x h/ml).

Der Folsäureantagonist Methotrexat wurde nur bei der Osteosarkomlinie SAOS - 2 getestet. Die Peak-Konzentration entspricht derjenigen Plasmakonzentration, die mit der klinischen Hochdosis - Therapie erreicht wird. MTX war bei beiden Methoden hochwirksam. (Serumspiegel 10^{-4} mol/l MTX bei 12 g/m^2 MTX).

Vincristin wurde bei der RD -, der SK - N - FI und der IMR - 32 Linie getestet, VP - 16 bei der SAOS - 2, RD und SK - N - FI.

Beide Zytostatika wirkten in beiden Methoden mit allen Konzentrationsstufen gut bis sehr gut, also auch schon bei 1/10 Peak-Konzentration nach 1 Stunde Exposition.
Die ähnlichen Kurvenverläufe beider Zytostatika in den Dosis - Wirkungskurven sind eventuell auf einen ähnlichen Wirkungsmechanismus zurückzuführen.

Die IMR - 32 Zellinie spricht viel schlechter auf Interferon an als die SK - N - FI Linie (siehe 3.4.). Trotzdem sind sich die Verlaufskurven der einzelnen Zytostatika zwischen den beiden Neuroblastomlinien jeweils viel ähnlicher als im Vergleich zu einer der beiden anderen (Nicht-Neuroblastom-) Zellinien.

"Generic name"	ausgetestete Zellinie	Gesamt - Wirksamkeit (0, +, ++, +++) Agar (1 h)	Monolayer (24 h)	Wirksamkeit bei 1/10 Peak-Konzentration Agar (1 h)	Monolayer (24 h)	
Actinomycin D	SAOS - 2	++	++	0	+	"Erholung" im Monolayer bei 1/10 PC
	RD	++	++	0	++	
Adriamycin	SAOS - 2	++	+++	0	++	
	SK - N - FI	++	+++	+	+++	
	IMR - 32	++	+++	++	+++	
BCNU	SK - N - FI	n.d.	+	n.d.	0	
	IMR - 32	0 - +	+	0	0 - +	
DTIC	RD	0 - +	+	0	0	
	SK - N - FI	0	+	0	0 - +	
	IMR - 32	0	+	0	0	
Cis - platinum	SAOS - 2	++	++	0	+	
	RD	++?	+++	0	++	
	SK - N - FI	+	+++	0	+++	
	IMR - 32	+	+++	+	+++	
Methotrexat	SAOS - 2	+++	+++	++	++	Plateau
Vincristin	RD	+++	+++	+++	+++	Vincristin und VP-16 ähnlicher Kurvenverlauf
	SK - N - FI	++	+++	+	+++	
	IMR - 32	+++	+++	++	+++	
VP - 16	SAOS - 2	+++	+++	+	++	
	RD	+++	+++	+++	+++	
	SK - N - FI	+++	n.d.	+++	n.d.	

Antiproliferative Wirksamkeit der verschiedenen Zytostatika gegen die getesteten Zellinien.
Vergleich: Monolayer - mit Agar - Methode
(0 = keine Wirkung, +++ = hochwirksam, n.d. = not done)

4.8. DISKUSSION der KOMBINATIONSERGEBNISSE

Es sind zur Zeit folgende Möglichkeiten denkbar, durch welche eine effektive antiproliferative Kombination von Medikamenten erreicht werden kann (33).

1. Manipulation der Wachstumskinetik durch

   a. gleichzeitige Gabe von 2 Medikamenten, die in verschiedenen Stadien des Zellzyklus wirksam sind.

   b. Synchronisation der Zellen in eine Phase durch das erste Medikament und anschließender Gabe des für diese Phase toxischen Medikaments.

2. Selektiver Angriff von Medikamenten, die nicht additiv toxisch sind, aber einen additiven therapeutischen Effekt versprechen. Nach diesem Gesichtspunkt wurden die meisten in der Klinik verwendeten Kombinationen ausgewählt.

3. Durch einen "Rescue-Effekt" wie bei MTX durch Citrovorum

4. Durch biologische Synergismen

   a. Hemmung von verschiedenen Enzymen in einer Enzymkette

   b. gleichzeitige Hemmung von alternativen Stoffwechselwegen für die Synthese essentieller Metaboliten

   c. komplementäre Hemmung durch Medikamente, von denen eines Makromoleküle schädigt und das andere den Reparaturmechanismus hemmt.

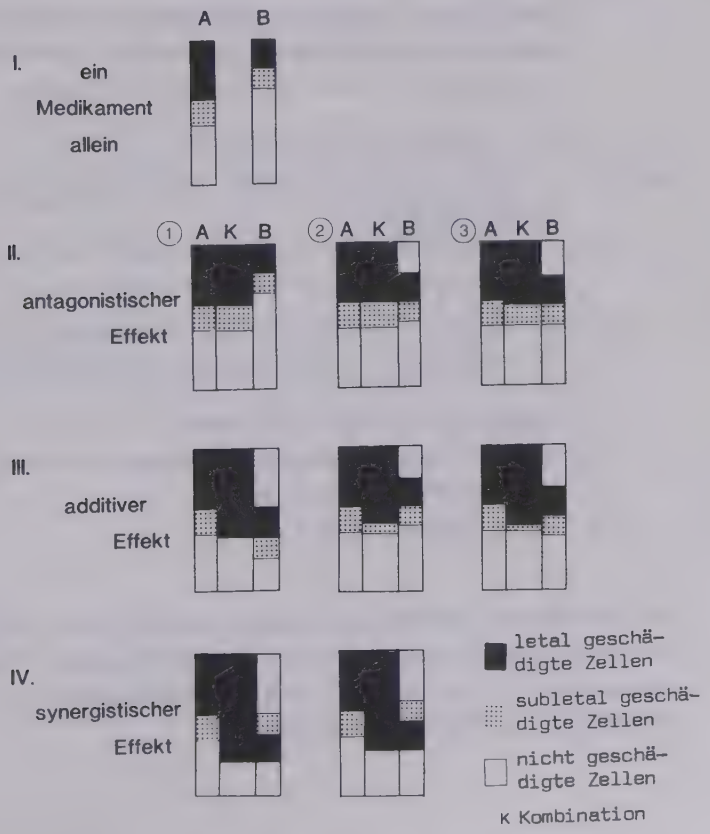
   d. Schädigung der Zellmembrane durch das eine Medikament ermöglicht das Eindringen des zweiten toxischen Medikaments.

Wie bei alleiniger Zytostatikaexposition, ist es auch hier möglich von der Target-Theorie auszugehen (4.7).
Um den Mechanismus der Wirkung von 2 Medikamenten auf eine Zellpopulation zu veranschaulichen, wurde ein einfaches Modell entworfen (Abb. 49).

Die Kombinationswirkung wird durch den verwendeten statistischen Test in 3 Kategorien, antagonistisch, additiv und synergistisch eingeteilt.

Modell einer Interaktion nach sequentieller Gabe 2er Medikamente A und B

Abb.: 49



Erläuterungen zu Abb. 36 :

zu I. Wenn die Medikamente einzeln gegeben werden, töten sie einen Teil der Zellen ab, einen weiteren Teil schädigen sie und der Rest überlebt ohne Veränderungen (siehe 3.7).

Antagonistische Ergebnisse* erhalten wir:

zu II.1 B "schädigt lethal oder sublethal" von A bereits abgetötete Zellen.

II.2 B "tötet" von A bereits abgetötete Zellen und schädigt von A schon geschädigte Zellen. Die gemeinsame Schädigung bleibt aber unter dem kritischen Punkt, die Zellen überleben.

II.3 Wie II.2, nur daß B von A geschädigte Zellen abtötet. Von hier ist der Übergang zur Subadditivität hin zu einem additiven Effekt fließend und lediglich eine Frage der Quantität, bzw. der statistischen Signifikanz.

Additivität (III) wird beobachtet:

zu III.1 B "tötet" die von A sublethal geschädigten oder ungeschädigten Zellen ab.

III.2 B "tötet" die von A schon lethal geschädigten Zellen ab, aber die sublethale Wirkung beider addiert sich.

III.3 B "tötet" von A abgetötete oder geschädigte Zellen und die sublethalen Wirkungen addieren sich teilweise.

Synergismus (IV) tritt auf; wenn

zu IV.1 B von A nicht geschädigte Zellen abtötet und die sublethalen Wirkungen sich ganz,

IV.2 oder teilweise addieren.

*Der von DREWINKO übernommene Antagonismusbegriff sagt nur aus, daß die Kombinationswirkung "signifikant nicht additiv" ist und ist damit nicht identisch mit dem Antagonismusbegriff der "gegenseitigen Behinderung" der Wirkung.

Es wurden in der Zeichnung jeweils Extreme dargestellt, zwischen denen alle Variationen möglich sind.
Wie DREWINKO (33) anführt, erwartet man bei Anwendung dieses Modells und des statistischen Testes weit mehr positive Interaktionen als in der klinischen Situation. Die Zellen befinden sich in der logarhythmischen Wachstumsphase, sodaß die meisten Zytostatika auf optimale Wirkungsbedingungen treffen (35).

Zusätzlich haben bei in-vitro-Versuchen die Zytostatika die Möglichkeit einer direkteren, toxischen Wirkung auf Zellen als bei in-vivo-Versuchen.

Hinzu kommt die, gemessen an klinischen empirischen Studien, kurze Beobachtungszeit, wodurch die Probleme einer Resistenzentwicklung und Remission der Tumorzellen außer acht gelassen werden, die aber letztendlich den Nutzen und Gebrauch in der Klinik bestimmen.

Die methodischen Schwierigkeiten von in-vitro-Versuchen wurde in 2.2.6. (Fehlerbetrachtung) schon ausgeführt. Andererseits können gerade solche effizient und ökonomisch durchzuführende in-vitro-Versuche den Hinweis für erfolgversprechende Kombinationen geben.

Es wurden erst einige wenige Untersuchungen über die Kombinationswirkung von Interferon und Zytostatika veröffentlicht.
Im ersten veröffentlichten Bericht von CHIRIGOS und PEARSON 1973 (24) wurde ein synergistischer Effekt von BCNU und Mäuse - IFN im Tierversuch mit LSTRA-Mäusen beobachtet.

GRESSER berichtete 1975 (4) von einem möglichen additiven Effekt mit der Kombination Cyclophosphamid und Mäuse - IFN - α bei Lymphomen in AKR Mäusen, mit einer Verlängerung der Überlebenszeit um 200 % gegenüber alleiniger Cyclophosphamidbehandlung.

Diese beiden Untersucher verabreichten die Zytostatika nur zu Versuchsbeginn und die Interferongabe wurde über mehrere Tage wiederholt. Dies ist deshalb von grossem Interesse, da SLATER (92) in Versuchen mit BDF/1 Mäusen mit L_{1210} Leukämie bei gleichzeitiger Gabe von Mäuse - IFN - α und 6 - Mercaptopurin, ADR, Cytosinarabinosid oder Cyclophosphamid über mehrere Tage keine signifikante Steigerung der Überlebensrate fand. In der gleichen Untersuchung erreichte er aber mit MTX und IFN - α oder MTX und 6 Mercaptopurin und IFN - α eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit.

Es gibt erst 2 Untersuchungen mit menschlichen Tumorzellen.

BROSTRÖM (19) untersuchte die Kombinationswirkung von MTX und IFN - α auf 2 Osteosarkomlinien und eine Lymphomlinie vom BURKITT Typ. Er beobachtete die Zellen 14 Tage im Monolayer, bzw. in der Suspensionskultur, er wertete 2 mal wöchentlich aus und wiederholte im Anschluß daran gleichzeitig die MTX - und IFN - Gabe.
Er schließt auf Grund seiner Überlebenskurven, daß die Kombination von MTX und IFN weder einen synergistischen noch hemmenden oder blockierenden Effekt auf das Zellwachstum bewirkte. Die Ergebnisse wurden keinem statistischen Test unterworfen oder eine Analyse der Daten für einen additiven Effekt durchgeführt.

Die andere Untersuchung wurde von AAPRO 1982 (1) veröffentlicht. Er testete mit der Agar - Methode mehrere Zytostatika mit IFN - α bei verschiedenen Linien. In dem Abstrakt sind die Ergebnisse mit der Myelomlinie 8226 bei Vinblastingabe und IFN - α dargestellt.

Es ergaben sich mit einstündiger Vinblastinexposition und anschließender einstündiger oder Dauerinterferonzugabe keine Synergismen, aber eine viel stärkere Wirkung der Kombination mit Unterschreitung des Erwartungswertes. Hingegen wurde bei Dauerexposition beider Medikamente ein signifikanter Synergismus gemessen.

Da es unmöglich war, alle Kombinationen zu untersuchen, haben wir uns auf wenige beschränkt.
Wir haben untersucht, ob nach zeitbegrenzter Zytostatikaexposition durch nachfolgende IFN-Gabe die Zellzahl weiter reduziert werden kann.

Als Zusammenfassung der Resultate wird eine U - Werte-Tabelle (siehe Nebenseite) der Diskussion der Ergebnisse vorangestellt.

Die einzelnen Zellinien werden nun getrennt besprochen:
Bei der osteogenen Sarkomlinie SAOS - 2 lagen mit MTX und IFN - B die U - Werte beider Methoden im additiven Bereich, der U - Wert der Monolayer - Methode ist allerdings um fast 4 niedriger.

Mit der Kombination MTX und IFN haben bereits BROSTÖM (19) und SLATER (92) Versuche durchgeführt.
Bei BROSTRÖM war mit der Monolayer-Methode bei der Osteosarkomlinie 393 T mit MTX und IFN - α der Kombinationseffekt nach 14 Tagen weitaus ausgeprägter als nach 4 Tagen. Bei seiner anderen Osteosarkomlinie T_2 56 schwankt der Kombinationswert um den wirksamsten Einzelwert.

U - Werte-Tabelle der Kombinations - Ergebnisse IFN / Zytostatika

W = Durchschnittswert von 3 Wochen
W_n = Einzelwerte der Wochen bei der Monolayer-Methode

	SAOS - 2			RD			SK - N - FI	IMR - 32		
	Agar - M.	W	Mono.-M. W_n	Agar - M.	W	Mono.-M. W_n	Agar - M.	Agar - M.	W	Mono.-M. W_n
Acto D	- 6,7	- 1,3	+ 0,2 - 4,9 - 0,7	- 0,4	- 1,6	- 4,8 - 0,1 - 1,3				
ADR	- 3,5	- 3,2	+ 1,8 - 4,6 - 4,6				- 1,9		- 2,0	- 2,3 - 2,5 - 1,2
Cis-p.	- 7,0	- 6,0	- 1,5 - 7,7 - 5,8		- 0,3	- 0,2 + 0,1 - 1,0	- 2,8	- 4,6	- 1,4	- 2,1 - 0,4 - 1,7
DTIC				+ 1,6	+ 0,5	+ 1,5 + 0,4 - 0,4	- 0,5	- 2,3	- 1,8	- 2,3 - 2,7 - 0,3
MTX	- 1,9	+ 2,0	+ 9,0 - 0,1 - 1,0							
Vin.				- 1,8	+ 0,6	+ 0,1 + 1,5 + 0,1	- 0,01	- 2,6	- 2,4	- 4,3 -12,0 - 1,7
VP-16	- 7,7	- 3,6	- 0,2 - 6,0 - 2,9	- 0,3	- 2,3	- 3,9 - 0,9 - 2,0	- 0,4	- 5,6	- 2,3	- 2,9 - 1,6 - 2,1

Synergismus: $U \leq -2{,}58$ Additiv: $U \leq |2{,}58|$ Antagonismus: $U \geq +2{,}58$

SLATER (92) fand gerade mit MTX und IFN - α im Gegensatz zu anderen Zytostatika in der Behandlung der Mäuseleukämie einen Synergismus.

Es stellt sich jetzt die Frage, wie weit die Unterschiede der Ergebnisse abhängig sind von der verwendeten Zellinie, der Verschiedenheit der Methoden, der IFN - Dosis, dem Interferon-Typ oder vom Therapieschema (siehe oben).

Von den anderen hier getesteten Zytostatika bei der SAOS - 2 wurden mit ADR, Cis-p., oder VP-16 und IFN - β die Erwartungswerte signifikant unterschritten, mit ActoD und IFN - β auch bei der Agar - Methode. Sämtliche U - Werte mit Ausnahme derer von ADR und Cis-p. waren bei der Agar - Methode wesentlich größer.

Dies kann methodenbedingt sein oder durch die bei der Agar - Methode verwendeten höheren Zytostatikakonzentrationen verursacht werden. Werden allerdings U - Werte nach der 2. Woche bei der Monolayer - Methode mit denen der Agar - Methode verglichen, sind die Unterschiede nicht mehr wesentlich.

Für die SAOS - 2 kann man zusammenfassend sagen, daß mit beiden Methoden die Ergebnisse mit allen Kombinationen in die gleiche Richtung eines additiven Effekts bei MTX, eines zumindest additiven bei ActoD und einer synergistischen Wirkung von ADR, Cis-p. oder VP-16 mit Interferon hinweisen.

Die Kombinationsergebnisse bei der Rhabdomyosarkomlinie RD lagen alle im additiven Bereich.
Der größte U - Wert-Abstand zwischen beiden Methoden betrug 2. Da mit der Ausnahme von ActoD bei beiden Methoden dieselben Zytostatikakonzentrationen verwandt wurden, müssen solche Schwankungen als methodenbedingt betrachtet werden. Mit DTIC und IFN - ß erhielten wir mit beiden Methoden negative U - Werte, so daß diese Kombination als nicht besonders effektiv angesehen werden muß.

Es bleibt die Frage, warum die RD - Linie weniger sensibel auf die Kombination von Interferon und Zytostatika reagiert als die SAOS - 2. Man kann die Ursache entweder in der Gewebsspezifität der Linien oder der viel geringeren Interferonempfindlichkeit der RD - Linie suchen.

Zusammenfassend gilt für die RD - Linie, daß mit beiden Methoden ähnliche Ergebnisse erzielt wurden und weder ein Synergismus noch eine Hemmung mit der Kombination beobachtet wurde. Der Kombinationseffekt ist wesentlich geringer ausgeprägt als bei der SAOS - 2.

Bei der nur mit der Agar - Methode getesteten Neuroblastomlinie SK - N - FI ergab sich allein mit Cis-p. und IFN - ß ein Synergismus und ein hoher positiver U - Wert für ADR und IFN - ß.

Im Vergleich mit der SAOS - 2 zeigte sich wieder eine Abhängigkeit der Ergebnisse von der Zellinie. Die Kombination Cis-p. und IFN - ß bewirkte bei beiden Methoden den mit am stärksten ausgeprägten Kombinationseffekt. Mit der aber bei der SAOS - 2 wirksamsten Kombination VP-16 und IFN - ß wurde bei der SK - N - FI gerade der Erwartungswert erreicht. Insgesamt konnten jedoch keine hemmenden oder blockierenden Effekte der Kombination beobachtet werden.

Die Kombinationseffekte bei der relativ interferonunempfindlichen Neuroblastomlinie IMR 32 sind am zweitstärksten ausgeprägt. Die Unterschiede zwischen den Zellinien können also vorläufig nicht auf eine verminderte Interferonempfindlichkeit zurückgeführt werden.
Alle U - Werte sind deutlich positiv, bei der Agar - Methode grösser und bei der Cis-p., Vin., oder VP-16 mit IFN - B synergistisch. Die IMR 32 ist nach diesen Ergebnissen für eine solche Kombinationsbehandlung geeignet.

Nach der Diskussion der einzelnen Resultate soll erörtert werden, in wieweit der Kombinationseffekt von folgenden Faktoren abhängig ist:

1. von der Unterschiedlichkeit der Zellinien
2. von der Verschiedenheit der angewandten Methoden
3. von der Empfindlichkeit der Linien gegenüber IFN
4. von der Konzentration der beteiligten Medikamente
5. von den
   a) angewandten Zytostatika und
   b) Interferonen
6. vom angewandten Therapieschema (Time scheduling).

zu 1.:
Die erste Frage ist beim Vergleich der Ergebnisse der RD - Linie mit IMR 32 leicht zu beantworten. Wir erhielten unter Konstanthaltung aller anderer Parameter deutlich verschiedene U - Werte; der Kombinationseffekt ist also abhängig von der Zellinie (siehe auch Vergleich mit BROSTÖM und SLATER). Gemeinsam war allen Zellinien, daß die Kombination immer wirksamer war als Einzelbehandlung, es konnten keine hemmenden oder blockierenden Effekte festgestellt werden.

Besonders Tumore, die der SAOS - 2 - Linie entsprechen, die also sehr empfindlich auf Interferon reagieren, scheinen für eine derartige Kombinationsbehandlung geeignet zu sein.

zu 2.:
Es wurden wie oben im Text schon angesprochen, größere Unterschiede der U - Werte und damit der Ergebnisse mit beiden Methoden erzielt, wobei mit der Agar - Methode meist die höheren U - Werte errechnet wurden. Gründe für diese Unterschiede wurden in 4.2. (Methodenvergleich) ausführlich diskutiert.
Als Gemeinsamkeit muß auf die mit beiden Methoden in die gleiche Richtung weisenden Ergebnisse hingewiesen werden; bzw. die U - Werte waren sich zwischen beiden Methoden innerhalb der gleichen Linien ähnlicher in Größe und Abstand, als mit der gleichen Methode zwischen 2 Linien.

zu 3.:
Die Abnahme der Größe des Kombinationseffektes ging bei uns nicht direkt parallel der verminderten Interferonempfindlichkeit, bei der IMR 32 wurden höhere U - Werte errechnet als bei der SK - N - FI. Dennoch waren bei der mit Abstand sensibelsten Linie SAOS - 2 die U - Werte wesentlich höher als bei den anderen Linien. Wir können damit behaupten, daß sich interferonempfindliche Tumore besser für eine Kombination eignen, zumal dann der Mockeffekt (siehe 4.4.) keine Rolle spielt.

zu 4.:
Eigentlich ist es sinnvoll, Kombinationsversuche mit absteigenden Konzentrationen der Medikamente durchzuführen. Eine solche Vorgehensweise macht die Ergebnisse zum einen um vieles valider, und zum anderen ließe sich die Frage der Konzentrationsabhängigkeit des Kombinationseffektes gleich mit beantworten. Wir konnten eine solche Untersuchung aus Zeitgründen nicht mehr angehen, sie ist aber für die Weiterarbeit an einer Kombinationsbehandlung dringend erforderlich.

zu 5.:
Wir führten alle Kombinationen mit IFN - β durch.
In allen anderen bisher unternommenen Kombinationsversuchen wurde IFN - α verwendet. Von keinem Untersucher wurde berichtet, daß Zytostatika in ihrer Wirkung durch IFN gehemmt werden.

Die Kombination beider Medikamente war immer zumindest ebenso effektiv wie die Einzelbehandlung, auch mit IFN - α würde über additive und synergistische Wirkungen in der Kombination berichtet. Eine interferonvergleichende Kombinationsuntersuchung, in die IFN - γ (3.S.) einbezogen ist, gibt es noch nicht.

zu 5 b.:
Wir versuchten eine möglichst große Zahl von Zytostatika zu testen. Dieselben Zytostatika unterschieden sich in der Stärke der kombinierten Wirkung mit IFN - β teilweise erheblich bei den verschiedenen Linien; vgl. U - Werte von VP - 16 und IFN - β bei SAOS - 2 und SK - N - FI.
Trotzdem können wir die Zytostatika in verschiedenen Gruppen ihrer Wirksamkeit in der Kombination einordnen.
Cis-p. war das wirksamste, gefolgt von VP-16 und ADR. Eine mittlere Gruppe bilden ActoD und Vin.. Mit MTX und mit DTIC schließlich wurde bei einstündiger Zytostatikaexposition kein Synergismus beobachtet.

Ein begrenzender Faktor in der Tumorbehandlung ist die Nebenwirkung der Medikamente. Die Nebenwirkungen nach Interferongabe sind, besonders im Verhältnis zu denen nach anderen Chemotherapeutika, relativ gering (97, 108), und es wurde bisher über keine überlappende Toxizität mit Zytostatika berichtet (97, 108). Daher könnten selbst weniger als additive Effekte, die auch nach einer Relativierung dieser Ergebnisse zu erwarten sind, ein Fortschritt in der Tumorbehandlung bedeuten.

Hinzu kommt, daß IFN nur einen Teil seiner antiproliferativen Wirkung direkt auf Zellen ausübt (63, 73).
Ein anderer Teil der Interferonwirkung wird in vivo über das Immunsystem vermittelt:
Hemmung der B - Zellaktivität durch IFN (42), aber Stimulation der Phagozytose (89), der Zytotoxität von Killer und NK - Zellen (90). Es ist denkbar, daß dadurch die Interferonwirkung bei der Tumorbehandlung noch verstärkt wird.
In vivo kompliziert die Hemmung des Immunsystems durch Zytostatika jedoch die Einschätzung dieser Wirkung.

Diese Untersuchungen lassen eine Kombinationsbehandlung von IFN - ß und Zytostatika in der Tumortherapie als eine mögliche Verbesserung der Behandlung erscheinen.

Veränderungen des Therapieschemas (Time scheduling) scheinen eine vielversprechende Entwicklung auf der Suche nach effizienteren Kombinationen zu sein. BENZ u.a. (12) erreichten in der Kombination von Zytostatika enorme Wirkungssteigerungen nach Veränderung der zeitlichen Verabfolgung der Medikamente.

Mit der Kombination IFN und Zytostatika gibt es hierzu erst eine Veröffentlichung von CESARIO (23), der allerdings Veränderungen des antiviralen Effektes von IFN - α und IFN - β nach vorhergehender oder gleichzeitiger Gabe von Zytostatika untersuchte. Bei Vorbehandlung der Zellen mit VCR, 6 Mercaptopurin und ADR oder bei gleichzeitiger Gabe von Vin. und IFN, war die antivirale Aktivität beider Interferone vermindert. Diese Untersuchung gewinnt an Bedeutung angesichts der wahrscheinlichen Parallelität der antiviralen und antiproliferativen Wirkung von Interferonen (99).

Deshalb wird ein Austesten von verschiedenen Kombinationen wichtig werden für weitere in-vitro-Untersuchungen und eine mögliche Verbesserung ihrer Anwendung in der Klinik.

Eine Zytostatikatherapie kann einen Tumor meist wesentlich verkleinern, eliminiert jedoch häufig nicht alle bösartigen Zellen. Bei kleiner Tumormasse zeigt IFN (GRESSER 43, 47, 48) seine größte Effektivität; eine Remission kann verlängert, vielleicht sogar ein Rezidiv verhindert werden (102, 108).

5. KURZE ZUSAMMENFASSUNG

Den Interferonen werden ausser ihrer antiviralen Eigenschaft noch Wirkungen auf das Immunsystem (u.a. Stimulation der Zytotoxitität von T - und NK - Zellen) und eine antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen zugeschrieben. In vivo ergaben sich in Einzelfällen bei verschiedenen Tumoren mit Interferon als Monotherapie bessere Erfolge als mit den üblichen zytostatischen Substanzen. Es laufen zur Zeit klinische Studien, in denen versucht wird, Interferon (IFN) in die Zytostatikatherapie zu integrieren z.B. IFN - ß bei der COSS 80 Studie bzw. der Neuroblastomstudie Stadium IV.

Es gab jedoch nur wenige in-vitro-Untersuchungen über die Kombination von IFN-α und Zytostatika, keine über IFN - ß.

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluß solcher Kombinationen auf das Tumorzellwachstum in vitro zu prüfen. Die menschlichen Neuroblastomlinien SK - N - FI und IMR 32, die Rhabdomyosarkomlinie RD und die osteogene Sarkomlinie SAOS - 2 wurden anhand der von SALMON und HAMBURGER entwickelten kolonienbildenden Agarmethode ausgetestet. Mit diesem Assay werden die sogenannten "Tumorstammzellen" gemessen. Diese Stammzellen sollen die Masse der differenzierten Tumorzellen erzeugen und bei Ausschwemmung die Zellen sein, die die Metastasen bilden.

Die Ergebnisse der Dosiswirkungskurven und der Kombination von IFN mit Zytostatika werden mit den Ergebnissen der Dissertationsarbeit von M. DILGER verglichen, der dieselben Versuche mit der bisher üblichen die Gesamtzahl aller Zellen berücksichtigenden Monolayermethode durchführte.

Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

1) IFN - α ist bei den getesteten Zellinien weniger antiproliferativ wirksam als IFN - ß, welches schwächer wirkt als IFN - γ.
2) Die antiproliferative Wirkung von IFN - ß ist konzentrations- und zeitabhängig, wobei verschiedene Zellinien auch desselben Tumortyps verschieden sensibel auf IFN reagieren.
3) Bei hohen IFN - ß Konzentrationen wird ein Teil der antiproliferativen Wirkung durch einen Mock-Effekt erzielt (nicht durch das IFN - Molekül selbst).

4) Die Dosis - Wirkungs - Kurven der einzelnen Zytostatika ergaben: Vincristin, VP-16, MTX und Adriamycin sind hoch wirksam; Cis - platinum und Actinomycin D sind wirksam; BCNU und DTIC wirken kaum antiproliferativ.

5) Die Kombination IFN - B / Zytostatikum war immer stärker wirksam als die der Einzelsubstanzen. Es konnten keine wachstumsfördernden oder die antiproliferative Wirkung hemmenden Effekte festgestellt werden.

6) Unabhängig von der Zellinie wurden mit MTX / IFN und DTIC/IFN die geringsten Kombinationseffekte erzielt. Mit Cis - platinum / Interferon, Adriamycin / IFN und VP-16 / IFN wurden die stärksten Zellreduktionen erreicht, schwächer wirksam waren die Kombinationen Actinomycin D / IFN und Vincristin / IFN.

7) In Hinsicht auf die Wachstumshemmung reagieren die Osteosarkomzellen SAOS - 2 am empfindlichsten auf die Kombinationen und auf IFN allein.

8) Obwohl mit der Kolonienbildenden Agarmethode und der Monolayermethode verschiedene Parameter des Tumorwachstums gemessen werden, zeigen die Ergebnisse in dieselbe Richtung und liegen quantitativ in derselben Grössenordnung.

Literaturverzeichnis

1. AAPRO, M.S., SALMON, S.E., ALBERTS, D.S.:
Schedule dependent synergism of vinblastine and cloned leukocyte interferon.
Third conference on human tumor cloning. Tucson, AZ., January 10 - 12, (1982)

2. ADAMS, A., STRANDER, H., CANTELL, K.:
Sensitivity of the Epstein - Barr virus transformed human lymphoid cell lines to interferon.
J. gen. Virol. 28, 207 - 217 (1975)

3. AGUET, M.:
High - affinity binding of ^{125}I - labelled mouse interferon to spezific cell surface receptor.
Nature 284, No. 5755, 459 - 461 (1980)

4. ALBERTS, D.S., VAN DAALEN WETTERS, T.:
The effect of phenobarbital on cyclophosphamide antitumor activity.
Cancer Research 36, 2785 - 2789 (1976)

5. ALBERTS, D.S., VAN DAALEN WETTERS, T.:
Rubidazone vs adriamycin : An evaluation of their differential toxicity in the spleen colony assay system.
Br. J. Cancer 34, 64 - 68 (1976)

6. ALBERTS, D.S., CHEN, H.-S.G., SALMON, S.E.:
In vitro assay : Pharmacologic considerations.
aus: SALMON, S.E.: Cloning of human tumor stem cells.
197 - 207, New York, (1980)

7. ALBERTS, D.S., CHEN, H.-S.G.:
Tabular summary of pharmacokinetic parameters relevant to in vitro drug assay.
aus: SALMON, S.E.: Cloning of human tumor stem cells
351 - 359, New York, (1980)

8. ANKEL, H., KRISHNAMURTI, C., BESANCON, F., STEFANOS, S., FALCOFE, E.:
Mouse fibroblast (type I) and immune (type II) interferons: Pronounced differences in affinity for gangliosides and in antiviral and antigrowth effects on mouse leukemia $L_{1210}{}^{R}$ cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, No. 5, 2528 - 2532 (1980)

9. BALKWILL, F., TAYLOR - PAPADIMITRIOU, J., FANTES, K.H.:
Human lymphoblastoid interferon can inhibit the growth of human breast cancer xenografts in athymic mice.
Europ. J. Cancer 16, 569 - 573 (1980)

10. BARENNDSEN, G.W.:
Analysis of tumor responses by excision and in vitro assay of cellular clonogenic capacity.
Br. J. Cancer 41, Suppl. IV, 209 - 216 (1980)

11. BARON, S., ISAACS, A.:
Absence of interferon in lungs from fatal cases of influenza.
Brit. Med. J. 56, 18 - 20 (1962)

12. BENZ, C., SCHOENBERG, M., CHOTI, M., CADMAN, E.:
Schedule dependent cytotoxicity of methotrexate and 5 - fluorouracil in human colon and breast tumor cell lines.
J. Clin. Invest.: 66, 1162 - 1165 (1980)

13. BERISH, Y., GUPTA, R., GUPTA, S.:
Differential efficacies of human type I and type II interferons as antiviral and antiproliferative agents.
Cell Biology 77, No. 10, 5928 - 5932 (1980)

14. BLALOCK, J.E., GEORGIADES, J.A., LANGFORD, M.P., JOHNSON, H.M.:
Purified human immune interferon has more potent anticellular activity than fibroblast or leukocyte interferon.
Cellular Immunology 49, 390 - 394 (1980)

15. BLEEHEN, N.M., STEPHENS, T.C.:
Chairman's summary of Section V.
Clonogenic cell survival after tumor excision.
Br. J. Cancer 41, Suppl. IV 257 - 258 (1980)

16. BORDEN, E.:
Interferon in recurrent breast cancer:
Prelimary report of the American Cancer Society clinical trials programm
Proc. A. A. C. R. abstr. 643 (1980)

17. BORECKY, L., FUCHSBERGER, N., HAJNICKA, V., STANCEK, D., ZEMLA, J.:
Distribution of antiviral and cell - inhibitory activity in interferon preparations.
Acta Virol. 16, 356 - 358 (1972)

18. BRADLEY, E.C., RUSCETTI, F.W.:
Effect of fibroblast, lymphoid, and myeloid interferon on human tumor colony formation in vitro.
Cancer Research 41, 244 - 249 (1981)

19. BROSTRÖM, L.-A.:
Combined effect of interferon and methotrexate on human osteosarcoma and lymphoma cell lines.
Cancer Letters 10, 83 - 90 (1980)

20. BROWN, J.M., RASEY, J.S.:
Chairman's summary of Section VI.
Intercomparisons of in situ and cell survival assays.
Br. J. Cancer 41, Suppl. IV, 312 - 314 (1980)

21. CANTELL, K., HIRVONEN, S.:
Preparation of human leukocyte interferon for clinical use.
Tex. Rep. Biol. Med. 35, 138 - 144 (1977)

22. CARNEY, D., GAZDAR :
In vitro cloning of small cell carcinoma of the lung.
In press (1982)

23. CESARIO, T.C., SLATER, L.M.:
Diminished antiviral effect of human interferon in the presence of therapeutic concentrations of antineoplastic agents.
Infection and Immunity, 27, No. 3, 842 - 845 (1980)

24. CHIRIGOS, M.A., PEARSON, J.W.:
Cure of murine leukemia with drug and interferon treatment.
J. Natl. Cancer Institute 51, No. 4, 1367 - 1368 (1973)

25. COCITO, D., De MAEYER, E., DESOMER, P.:
Metabolism of nucleic acids in uninfected fibroblasts incubated in vitro with rat interferon.
Life Sci. 4, 1253 - 1262 (1965)

26. CRANE, J.L. jr., GLASGOW, L.A., KERN, E.R., YOUNGNER, J.S.:
Inhibition of murine osteogenic sarcomas by treatment with type I or type II interferon.
J. Natl. Cancer Inst. 61, No. 3, 871 - 874 (1978)

27. CUPPLES, C.G., TAN, Y.H.:
Effect of human interferon preparations on lymphoblastogenesis in Down's syndrome.
Nature 267, 165 - 167 (1977)

28. DAHL, H., DEGRÉ, M.:
Human interferon and cell growth inhibition
I. Inhibitory effect of human interferon on the growth rate of cultured human cells.
Acta Path. microbiol. Scand. Sect. B 84, 285 - 292 (1976)

29. DAKE, H., DEGRÉ, M.:
Micro assay for mouse human interferon
Acta Path. microbiol. Scand. Sect. B 84, 285 - 292 (1976)

30. DANNECKER, G., TREUNER, J., BUCK, J., NIETHAMMER, D.:
Colony forming capacity of established cell lines after continuous and time limited exposure to B - interferon compared to the induction to 2' - 5' - synthetase.
2nd Annual International Congress for Interferon Research
October 1981, San Francisco (1981)

31. The use of in vitro methods to predict tumor response to chemotherapy.
Br. J. Cancer 41, Suppl. IV, 195 - 198 (1980)

32. DORR, R.T., FRITZ, W.L.:
Cancer Chemotherapy Handbook
New York (1980)

33. DREWINKO, B., LOO, T.L., BROWN, B., GOTTLIEB, J.A., FREIREICH, E.J.:
Combination chemotherapy in vitro with adriamycin.
Observation of additive, antagonistic and synergistic effects when used in two drug combinations on cultured human lymphoma cells.
Cancer Biochem. Biophys., 1, 187 - 195 (1976)

34. DREWINKO, B., ROPER, P.R., BARLOGIE, B.:
Patterns of cell survival following treatment with antitumor agents in vitro.
Br. J. Cancer, 15, 93 - 99 (1979)

35. DREWINKO, B., PATCHEN, M., LI-YING YANG, BARLOGIE, B.:
Differential killing efficacy of twenty antitumor drugs on proliferating and nonproliferating human tumor cells.
Cancer Research 41, 2328 - 2333 (1981)

36. MEYER - EICHBERGER, B., MEYER - EICHBERGER, S.:
Antiproliferativer Effekt von IFN - α und IFN - β bei menschlichen Tumorzellinien.
Inauguraldissertation, Tübingen (1982)

37. EIFE, R., HAHN, T., de TAVERA, M., SCHERTEL, F., HOLTMANN, H., EIFE, G., LEVIN, S.:
A comparsion of the antiproliferative and antiviral activities of alpha, beta and gamma interferons: Description of a simple unified assay for comparing both effects simultaneously.
Im Druck (1981)

38. EINHORN, S., STRANDER, H.:
Is interferon tissue specific? - Effect of human leukocyte and fibroblast interferons on the growth of lymphoblastoid and osteosarcoma cell lines.
J. gen. Virol., 35, 573 - 577 (1976)

39. FOGH, J., WRIGHT, C.W., LOVELESS, J.D.:
Absence of Hela cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors
J. Natl. Cancer Inst., 58, 209 - 214 (1977)

40. FOWLER, J.F.:
Conference summary, Comments and Conclusions from experimental studies.
Br. J. Cancer, 41, Suppl. IV, 315 - 322 (1980)

41. FUCHSBERGER, N., HAJNICKA, V., BORECKY, L.:
Antiviral and cell - growth inhibitory activities of highly-purified L cell interferon. An analysis of quantitative disproportions.
Acta Virol., 19, 59 - 61 (1975)

42. GISLER, R.H., LINDAHL, P., GRESSER, I.:
Effects of interferon on antibody synthesis in vitro.
J. Immunol., 113, 438 - 444 (1974)

43. GRESSER, I., BOURALI, C.:
Antitumor effects of interferon preparations in mice.
J. Nat. Cancer Instit., 45, 365 - 375 (1970)

44. GRESSER, I., BROUTY - BOYE, D., THOMAS, M.T., MACIEIRA - COELHO, A.:
Interferon and cell division. Inhibition of the multiplication of mouse leukemia L_{1210} cell multiplication in vitro by interferon preparations.
Proc. Natl. Acad. Sci., 65, 1052 - 1058 (1970)

45. GRESSER, I., BROUTY - BOYE, D., THOMAS, M.T., MACIEIRA - COELHO, A.:
Interferon and cell division. II. Influence of various experimental conditions on the inhibition of L_{1210} cell multiplication in vitro by interferon preparations.
J. Nat. Cancer Instit., 45, 1145 - 1153 (1970)

46. GRESSER, I., THOMAS, M.T., BROUTY - BOYE, D.:
Effect of interferon treatment of L_{1210} cells in vitro on tumor and colony formation.
Nature 231, 20 - 21 (1971)

47. GRESSER, I.:
Antitumor effects of interferon.
Advanc. Cancer Res., 16, 97 (1972)

48. GRESSER, I., MAURY, C., BROUTY - BOYE, D.:
On the mechanism of the antitumor effect of interferon in mice.
Nature 239, 167 (1972)

49. GRESSER, I., BANDU, M.T., TOVEY, M., BODO, G., PAUCKER, K., STEWART II, W.E.:
Interferon and cell division VII. Inhibitory effect of highly purified interferon preparations on the multiplication of Leukemia L_{1210} cells.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 142, 7 - 10 (1973)

50. GRESSER, I., BANDU, M.T., BROUTY - BOYE, D.:
Interferon and cell division. IX. Interferon - resistent L_{1210} cells: Characteristics and origin.
J. Natl. Cancer Inst. 52, 553 - 559 (1974)

51. GRESSER, I.:
On the varied biologic effect of interferon.
Cellular Immunol. 34, 406 - 415 (1977)

52. GRESSER, I., MAURY, C., TOVEY, M.:
Efficacy of combined interferon cyclophosphamide therapy after diagnosis of lymphoma in AKR mice.
Europ. J. Cancer 14, 97 - 99 (1978)

53. GUTTERMANN, J.U.:
Leukocyte interferon induced tumor regression in human breast cancer.
First annual congress for interferon research, Washington D.C. (1980)

54. HAMBURGER, A.W., SALMON, S.E.:
Primary bioassy of human tumor stem cells.
Science 197, 461 - 463 (1977)

55. HAMBURGER, A.W.:
Cloning of human tumor cells in soft agar.
TCA Manual, Vol. 5, No. 3, 1141 - 1145 (1979)

56. HAMBURGER, A.W., SALMON, S.E., ALBERTS, D.S.:
Direct cloning of human ovarian carcinoma cells in agar.
Cancer Research 38, 3438 - 3444 (1978)

57. HARTLEY - ASP, B.:
Differences in the sensitivity of cell survival assays due to methodological aspects, choice of cell type and rates of metabolic degradation.
Br. J. Cancer 41, Suppl. IV, 155 (1980)

58. HILFENHAUS, J., KARGES, H.E.:
Growth inhibition of human lymphoblastoid cells by interferon preparations, obtained from human leukocytes.
Z. Naturforsch. C. 29, 618 - 622 (1974)

59. HILFENHAUS, J., DAMM, H., KARGES, H.E., MANTHEY, K.F.:
Growth inhibition of human lymphoblastoid Daudi cells in vitro by interferon preparations.
Arch. Virol. 51, 87 - 97 (1976)

60. HILFENHAUS, J., DAMM, H., JOHANNSEN, R.:
Sensitivity of various human lymphoblastoid cells to the antiviral and anticellular activity of human leukocyte interferon.
Archives of Virology 54, 271 - 277 (1977)

61. HILL, N.O.:
Human leukocyte interferon trials in cancer and leukemia.
J. Clinical Hematology and Oncology 11, Nr. 11 23 - 37 (1981)

62. ISAACS, A., LINDEMANN, J.:
Virus interference. I. The interferon
Proc. Royal Soc. B 147, 258 - 267 (1957)

63. ISAACS, A., WESTWOOD, M.A.:
Duration of protective action of interferon against infections with West Nile Virus.
Nature, 184, 1232 - 1233 (1959)

64. KNIGHT, E.Jr.:
Interferon: effect on the saturation density to which mouse cells will grow in vitro.
J. Cell. Biol. 56, 846 - 849 (1973)

65. KNIGHT, E.Jr.:
Interferon purification and initial characterisation from human diploid cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73, 520 - 523 (1975)

66. KNIGHT, E.Jr.:
Antiviral and cell growth inhibitory activities reside in the same glycoprotein of human fibroblast interferon.
Nature 262, 302 - 303 (1976)

67. KNIGHT, E.Jr.:
Human Fibroblast Interferon: Amino Acid Analysis and Amino Terminal Amino Acid Sequence.
Science 207, 525 - 527 (1980)

68. KUWATA, T., FUSE, A., SUZUKI, N., MORINAGA, N.:
Comparison of the suppression of cell and virus growth in transformed human cells by leukocyte and fibroblast interferon.
J. gen. Virol. 43, 436 - 439 (1979)

69. LEA, D.E.:
Action of radiation on living cells.
Cambridge University Press, London (1955)

70. LEVY, H.B., MERIGAN, T.C.:
Interferon and uninfected cells
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 53 - 55 (1966)

71. LINDAHL - MAGNUSSON, P., LEARY, P., GRESSER, I.:
Interferon and cell division. VI. Inhibitory effect of interferon on the multiplication of mouse embryo and mouse kidney cells in primary cultures.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 138, 1044 - 1050 (1971)

72. LINDAHL, P., LEARY, P., GRESSER, I.:
Enhacement by interferon of the specific cytotoxicity of sensitized lymphocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 721 - 725 (1972)

73. LINDAHL, P., LEARY, P., GRESSER, I.:
Enhacement by interferon of the expression of surface antigens on murine leukemia L_{1210} cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2785 - 2788 (1973)

74. LOCKART, R.Z., Jr.:
The necessity for cellular RNA and protein synthesis for viral inhibition from interferon.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, 513 - 518 (1964)

75. LOCKART, R.Z., Jr.:
Criteria for acceptance of a viral inhibitor as an interferon and a general description of the biological properties of known interferons.
in: Interferons and Interferon Inducers, pp. 11 - 27
Amsterdam: North Holland Publ. Co. (1973)

76. LUDWIG, H., SCHERNTHANER, G., SWETLY, P.:
Interferon inhibits in vitro colony formation of myeloma stem cells.
Eur. J. of Cl. Inv. 10 (W_2), 24 (1980)

77. MARTIN, W.M.C., Mc NALLY, N.J.:
Cytotoxicity of adriamycin to tumor cells in vivo and in vitro.
Br. J. Cancer 42, 881 - 889 (1980)

78. Mc ALLISTER, J.:
A continuous human cell line derived from rhabdomyosarcoma
Cancer 24, 520 - 526 (1969)

79. MERIGAN, T.C.:
Prelimary observations on the effect of human leukocyte interferon in non Hodgkin's lymphoma.
N. England J. Medicine 229, 1449 - 1453 (1978)

80. NAGATA, S., TAIRE, H.:
Synthesis in E.coli of a polypeptide with human leukocyte interferon activity.
Nature 284, 316 - 320 (1980)

81. PAUCKER, K., CANTELL, K., HENLE, W.:
Quantitative studies on viral interference in suspended L - cells.
III. Effect of interfering viruses and interferon on the growth rate of cells.
Virology 17, 324 - 334 (1962)

82. PFEFFER, L.M., MURPHY, J.S., TAMM, I.:
Interferon effects on the growth and division of human fibroblasts.
Exp. Cell Research 121, 111 - 120 (1979)

83. PFEFFER, L.M., WANG, E., LANDSBERGER, F.K., TAMM, I.:
Plasma membrane and cytoskeleton of interferon - treated human cells.
In: Report of the IInd International Workshop on Interferons.
Rockefeller Univ. Press, New York (1980)

84. REVEL, M., BASH, D., RUDDLE, F.H.:
Antibodies to a cell - surface component coded by human chromosome 21 inhibit action of interferon.
Nature 260, 139, (1976)

85. ROCKWELL, S.:
In vivo - in vitro tumor cell lines: Characteristics and limitations as modells for human cancer.
Br. J. Cancer 41, Suppl. IV, 118 - 122 (1980)

86. SALMON, S.E.:
Cloning of human tumor stem cells
New York (1980)

87. SALMON, S.E., ALBERTS, D.S., MEYSKENS, F.L., DURIE, G.M., SOEHNLEIN, B., MOON, T.E.:
Clinical correlations of in vitro drug sensivity.
Aus: SALMON, S.E., Cloning of human tumor stem cells
223 - 245, New York, (1980)

88. SCHATTNER, A., MERLIN, G., WALLACH, D., ROSENBERG, H., BINO, T., LEVIN, S., REVEL, M.:
Monitoring of interferon therapy by assay of (2' - 5') oligo-isoadenylate synthetase in human peripheral white blood cells.
J. Interferon Research 4, 587 - 595 (1981)

89. SCHULTZ, R.M., PAPAMATHEAKIS, J.D., CHIRIGOS, M.A.:
Interferon: An inducer of macrophage activation by polyanions.
Science 197, 674 - 676 (1977)

90. SENIK, A., GRESSER, I., MAURY, C., GIDLUND, M., ORN, A., WIGZELL, H.:
Enhacement by interferon of natural killer cell activity in mice.
Cell Immunol. 44, 186 - 200 (1979)

91. SHIBATA, H., TAYLOR - PAPADIMITRIOU, J.:
Effect of human lymphoblastoid interferon on cultured breast cancer cells.
in: The biology of the interferon system; Biomedical Press Elsevier / Holland (1981)

92. SLATER, L.M., WETZEL, M.W., CESARIO, T.:
Combined interferon - antimetabolite therapy of murine L_{1210} leukemia.
Cancer 48, 5 - 9 (1981)

93. STEEL, G.G., PECKHAM, M.J.:
Human tumour xenografts.
Br. J. Cancer 41, Suppl. IV, 133 - 141 (1980)

94. STEWART II, W.E., GRESSER, I., TOVEY, M.G., BANDU, M.T., Le GOFF, S.:
Identification of the cell - multiplication - inhibitory factors in interferon preparations as interferons.
Nature 262, 300 - 303 (1976)

95. STEWART II, W.E., LIN, L.S., WIRANOWSKA - STEWART, M.:
Antiviral and other activities of pure interferons and interferoids.
Proceedings of the IVth Int. Cong. Virology, Den Haag, Netherlands (1978)

97. STEWART II, W.E.:
Interferon Nomenclature Recommendations
J. Infectious Diseases 142, No. 4 643 (1980)

98. STRANDER, H., CANTELL, K., CARLSTRÖM, G., JAKOBSSON, P.A.:
Clinical and laboratory investigations on man: Systemic administration of potent interferon to man.
J. Natl. Cancer inst. 51, 733 - 742 (1973)

99. STRANDER, H.:
Interferons: Anti - neoplastic drugs?
Blut, 35, 277 - 288 (1977)

100. STRANDER, H.:
Antitumor effects of interferon and its possible use as an antineoplastic agent in man.
Texas Rep. Biol. Med. 35, 429 - 435 (1977)

101. STRANDER, H., EINHORN, S.:
Effect of human leukocyte Interferon on the growth of human osteosarkoma cells in tissue culture.
Int. J. Cancer 19, 468 - 473 (1977)

102. STRANDER, H.:
Clinical trials conducted with interferon on tumor patients in europe.
aus: The biology of the interferon system
Elsvier, North Holland, Biomedical Press 169, 387 - 391 (1981)

103. TAN, Y.H., TISCHFIELD, J., RUDDLE, F.H.:
The linkage of the genes for human interferon - induced antiviral protein and indophenol oxidase - B traits to chromosome G - 21.
J. Exp. Med. 137, 317 - 330 (1973)

104. TAN, Y.H., CREAGAN, R.P., RUDDLE, F.M.:
Assignment of the genes for the human interferon system to chromosomes 2 and 5.
Genet. 13, 155 - 157 (1974)

105. TAN, Y.H., CREAGAN, R.P., RUDDLE, F.M.:
The somatic cell genetics of human interferon loci to chromosomes 2 and 5.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2251 - 2255 (1974)

106. TREUNER, J., DANNECKER, G., NIETHAMMER, D.:
Effect of Interferon on the cell growth under experimental and clinical conditions.
16th workshop for pediatric research
Europ. J. Ped. 185, 133 (1980)

107. TREUNER, J., NIETHAMMER, D., DANNECKER, G., JASKE, A., ALDENHOFF, P., KREMERS, B., NESSLER, G., BÖRNER, H.:
Treatment of Nasopharingeal - carcinoma in children with fibroblast interferon.
in Grundmann et al. eds, Cancer Campaign Vol. 5, 309 - 317
Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York (1981)

108. TREUNER, J., NIETHAMMER, D., BERTHOLD, F., LAMPERT, F.:
Comperative treatment of childhood neuroblastoma with human fibroblast interferon.
Second annual international congress for interferon research.
San Francisco CA., October 21 - 23 (1981)

109. TREUNER, J., DANNECKER, G.:
Interferon - Grundlagen und bisherige klinische Anwendung
Fortschritte der Medizin Nr. 21, 807 - 813 (1981)

110. TREUNER, J., DANNECKER, G., JOESTER, K.E., HETTINGER, A., NIETHAMMER, D.:
Pharmacological aspects of clinical stage I/II trials with human beta interferon in children.
J. Interferon Research 1, No. 3 373 - 380 (1981)

111. TROTT, K.R.:
Can tumor response be assessed from biopsy?
Br. J. Cancer 41, Suppl. IV, 163 - 170 (1980)

112. TUMILOWICZ, J.J., NICOLS, W.W., CHOLON, J.J., GREENE, A.E.:
Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma
Cancer Research 30, 2110 - 2118, (1970)

113. VALERIOTE, F.A., TOLEN, S.J.:
Survival of hematopoietic and lymphoma colony - forming cells in vivo following the administration of a variety of alkylating agents.
Cancer Research 32, 470 - 476 (1972)

114. VALLBRACHT, A., TREUNER, J., FLEHMING, B., JOESTER, K.E., NIETHAMMER, D.:
Interferon - neutralizing antibodies in a patient treated with fibroblast interferon.
Nature 289, 496 - 497 (1981)

115. WANATABE, Y., SOKAWA, Y.:
Effect of Interferon on the cell cycle of BALB/c3T3 cells
J. Gen. Virol. 41, 411 - 415 (1973)

116. WINKLER, K.:
Cooperative osteosarkoma study (COSS 80)
Meeting of the german society of ped iatic oncology.
Frankfurt (8.12.1979)

117. WIRANOWSKA – STEWART, M., STEWART II, W.E.:
The role of human chromosome 21 in sensitivity to interferon.
J. Gen. Virol. 37, 629 – 634 (1977)

118. WIRANOWSKA – STEWART, M., LIN, L.S., CHUDZIO, T., STEWART II, W.E.:
Contributions of carbohydrate moieties to the physical and biological properties of human leukocyte, lymphoblastoid and fibroblast interferons.
Abst. Ann. Meeting Amer. Soc. Microbiol. (1978)

Verzeichnis der Abkürzungen

1. Zellinien

RD	Rhabdomyosarkomlinie
SAOS - 2	Osteosarkomlinie
IMR - 32	Neuroblastomlinie
SK - N - FI	Neuroblastomlinie

2. Zytostatika

Act.D	Actinomycin D
ADR	Adriamycin
BCNU	Carmustine
Cis-p.	Cis - platinum
VCR = Vin	Vincristin
VP 16	VP - 16

3. Interferone

IFN - α	Leukozyteninterferon
IFN - B	Fibroblasteninterferon
IFN - γ	Immuninterferon
Mock-Interferon	inaktiviertes Interferon
I.U. = IU	International Interferon Units

4. Zellkulturmaterialien

FKS	Fetales Kälberserum
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
MEM	Minimal Essential Medium

5. Pharmakokinetische Parameter

P.C.	"Peak - Konzentration" in Serum
CXT	Produkt aus Plasmakonzentration und Zeit

6. Pädiatrisch - onkologische Therapiestudien

COSS 80	kooperative Osteosarkom - Studie (Beginn 1980)
NBL 81	Neuroblastomstudie (Beginn 1981)

Diese Arbeit verdanke ich dem Zusammentreffen mehrerer glücklicher Umstände.
Ich danke Herrn Prof. Dr. D. Niethammer für die Überlassung dieser Arbeit.
Für Anleitung, Unterstützung und besonderes persönliches Engagement bin ich Herrn Dr. Jörn Treuner und Herrn Dr. Günter Dannecker zu grossem Dank verpflichtet.
Viele Anregungen und Unterstützung durfte ich von Herrn Manfred Dilger erfahren, u.a. für die teilweise Überlassung der Ergebnisse seiner Dissertationsarbeit, wofür ich ihm sehr verbunden bin.

L e b e n s l a u f

Am 6. August 1956 wurde ich, Jochen Buck, als erstes Kind des Lehrers Richard Buck und seiner Ehefrau Gertrud geborene Reusch geboren.

1963 bin ich in die Grundschule Neuhausen aufgenommen worden und ab Dezember 1966 besuchte ich das Gymnasium in Metzingen. Dort legte ich im Juni 1975 das Abitur ab.

Anschließend leistete ich bis Oktober 1976 meinen Zivildienst als Betreuer einer Gruppe von 9 schwerbehinderten jungen Männern in den Mariaberger Heimen bei Gammertingen ab.

Im Oktober 1976 begann ich an der Universität Tübingen mit dem Studium der Medizin.

Das Physikum bestand ich im August 1979.

Am 20. Oktober 1983 lege ich in Tübingen das Staatsexamen in Medizin ab.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45